

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

CT/JP00/05868

日本特許庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

27.09.00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

2000年 8月24日

REC'D 17 NOV 2000

出願番号  
Application Number:

特願2000-254680

WIPO PCT

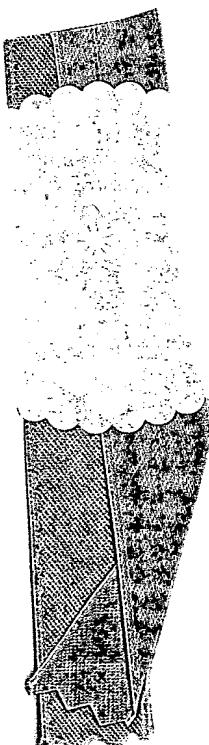
出願人  
Applicant(s):

日本たばこ産業株式会社

JP 00/05868

Eku

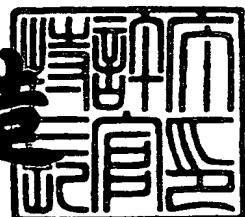
PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



2000年11月 6日

特許長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3090101

【書類名】 特許願

【整理番号】 J00-0132

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 39/395

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-2 日本たばこ産業株式会社 医薬探索研究所内

【氏名】 手塚 克成

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-2 日本たばこ産業株式会社 医薬探索研究所内

【氏名】 渡部 良広

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県流山市東深井869-17

【氏名】 安部 良

【特許出願人】

【識別番号】 000004569

【氏名又は名称】 日本たばこ産業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100100217

【弁理士】

【氏名又は名称】 大東 輝雄

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成11年特許願第242672号

【出願日】 平成11年 8月30日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 058632

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9803681

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 免疫性疾患治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 AILIMを介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる関節症を抑制、治療または予防するための医薬組成物。

【請求項 2】 該物質が、AILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIM発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質であることを特徴とする請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】 該サイトカインが、Th1タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ であるか、またはTh2タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン4であることを特徴とする請求項 1 または請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】 該関節症が、関節リウマチであることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 3 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 5】 該関節症が、変形性関節症であることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 3 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 6】 該物質が、蛋白性物質であることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 5 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 7】 該蛋白性物質が、下記群から選ばれるいずれかであることを特徴とする請求項 6 に記載の医薬組成物：

- a) AILIMに結合する抗体またはその一部；
- b) AILIMの細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド；
- c) AILIMの細胞外領域の全部または一部と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチド；及び
- d) AILIMに結合するポリペプチド。

【請求項 8】 該物質が、非蛋白性物質であることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 5 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 9】 該非蛋白性物質が、DNA、RNAまたは化学的に合成され

た化合物であることを特徴とする請求項8に記載の医薬組成物。

【請求項10】 AILIMを介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる炎症を抑制、治療または予防するための医薬組成物。

【請求項11】 該物質が、AILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIM発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質であることを特徴とする請求項10に記載の医薬組成物。

【請求項12】 該サイトカインが、Th1タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ であるか、またはTh2タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン4であることを特徴とする請求項11に記載の医薬組成物。

【請求項13】 該炎症が、肝炎であることを特徴とする請求項10乃至請求項12のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項14】 該物質が、蛋白性物質であることを特徴とする請求項10乃至請求項13のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項15】 該蛋白性物質が、下記群から選ばれるいずれかであることを特徴とする請求項14に記載の医薬組成物：

- a) AILIMに結合する抗体またはその一部；
- b) AILIMの細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド；
- c) AILIMの細胞外領域の全部または一部と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチド；及び
- d) AILIMに結合するポリペプチド。

【請求項16】 該物質が、非蛋白性物質であることを特徴とする請求項10乃至請求項13のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項17】 該非蛋白性物質がDNA、RNAまたは化学的に合成された化合物であることを特徴とする請求項16に記載の医薬組成物。

【請求項18】 AILIMを介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質及び薬学的に許容され得る担体を含んでなり、移植片対宿主反応、移植片対宿主反応または組織若しくは臓器の移植に伴う免疫拒絶反応を抑制、治療または予防

するための医薬組成物。

【請求項19】 該物質が、AILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIM発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質であることを特徴とする請求項18に記載の医薬組成物。

【請求項20】 該サイトカインが、Th1タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ であるか、またはTh2タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン4であることを特徴とする請求項19に記載の医薬組成物。

【請求項21】 該物質が、蛋白性物質であることを特徴とする請求項18乃至請求項20のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項22】 該蛋白性物質が、下記群から選ばれるいずれかであることを特徴とする請求項21に記載の医薬組成物：

- a) AILIMに結合する抗体またはその一部；
- b) AILIMの細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド；
- c) AILIMの細胞外領域の全部または一部と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチド；及び
- d) AILIMに結合するポリペプチド。

【請求項23】 該物質が、非蛋白性物質であることを特徴とする請求項18乃至請求項20のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項24】 該非蛋白性物質が、DNA、RNAまたは化学的に合成された化合物であることを特徴とする請求項23に記載の医薬組成物。

【請求項25】 AILIMを介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質及び薬学的に許容され得る担体を含んでなり、外来抗原または自己抗原により惹起される免疫反応を抑制するための医薬組成物。

【請求項26】 該免疫反応が、該抗原に対する抗体の産生、細胞増殖、またはサイトカインの産生であることを特徴とする請求項25に記載の医薬組成物

【請求項27】 該物質が、AILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIM発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質であることを

特徴とする請求項25または請求項26に記載の医薬組成物。

【請求項28】 該サイトカインが、Th1タイプのT細胞が產生するサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ であるか、またはTh2タイプのT細胞が產生するサイトカインであるインターロイキン4であることを特徴とする請求項27に記載の医薬組成物。

【請求項29】 該物質が、蛋白性物質であることを特徴とする請求項25乃至請求項28のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項30】 該蛋白性物質が、下記群から選ばれるいずれかであることを特徴とする請求項29に記載の医薬組成物：

- a) AILIMに結合する抗体またはその一部；
- b) AILIMの細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド；
- c) AILIMの細胞外領域の全部または一部と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチド；及び
- d) AILIMに結合するポリペプチド。

【請求項31】 該物質が、非蛋白性物質であることを特徴とする請求項25乃至請求項28のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項32】 該非蛋白性物質が、DNA、RNAまたは化学的に合成された化合物であることを特徴とする請求項31に記載の医薬組成物。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

##### 【発明の属する技術分野】

本発明は、AILIM (activation inducible lymphocyte immunomodulatory molecule; 別名を「JTT-1抗原」、「JTT-2抗原」、「ICOS (inducible co-stimulator)」または「8F4」という。) の生物活性、特にAILIMを介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質を含んでなる医薬組成物に関する。

具体的には、本発明は、AILIM発現細胞の増殖を制御（例えば抑制）するか、またはAILIM発現細胞によるサイトカイン（例えば、インターフェロン $\gamma$ またはインターロイキン4など）の產生を制御（例えば抑制）する活性を有する物質を含んでなる医薬組成物に関する。

さらに具体的には、本発明は、(1)関節症（例えば、関節リウマチ（rheumatoid arthritis; RA）、変形性関節症（osteoarthritis; OA））を抑制、治療または予防するための医薬組成物；(2)炎症（例えば、肝炎）を抑制、治療または予防するための医薬組成物；(3)移植片対宿主反応（graft versus host reaction; GVH reaction）、移植片対宿主病（graft versus host disease; GVHD）または組織若しくは臓器の移植に伴う免疫拒絶反応を抑制、治療または予防するための医薬組成物；(4)外来抗原若しくは自己抗原により惹起される免疫反応（例えば、該抗原に対する抗体の産生、細胞増殖、サイトカインの産生など）を抑制または予防するための医薬組成物に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

哺乳動物の生体は、体内に侵入した病原微生物（ウイルス、細菌、寄生虫など）や外来異物など（以下、併せて「抗原」と呼ぶ。）を排除しようとする免疫応答システムを有する。その1つは、自然免疫応答システムと呼ばれ、他の1つは獲得免疫応答システムと呼ばれるものである。前者は、食細胞（多形核白血球、単球、マクロファージなど）による貪食、ナチュラルキラー（NK）細胞による攻撃、及び補体による抗原のオプソニン化などのような非特異的な認識による排除機構である。後者の獲得免疫応答システムは、該抗原に対する特異性を獲得（活性化）したリンパ球（主にT細胞、B細胞）による排除機構である。

## 【0003】

抗原特異性を獲得したB細胞は、該抗原に特異的な抗体を産生することにより細胞外に存在する該抗原を攻撃する。抗原特異性を獲得（活性化）したT細胞は、ヘルパーT細胞と細胞傷害性T細胞（cytotoxic T cell; cytotoxic lymphocyte; CTL）に分類され、前者はB細胞の分化や抗体の産生を調節するとともに食細胞と協同して該抗原を破壊する。後者は、自らウイルス感染細胞などを攻撃する（実験医学（別冊）・「Bio Science用語ライブラリー〔免疫〕」、羊土社、p.14-17、1995）。

## 【0004】

このT細胞による抗原特異性の獲得（活性化）は、T細胞が、マクロファージ

、B細胞あるいは樹状細胞などの抗原提示細胞 (antigen-presenting cells: APC) により提示される抗原を認識することにより開始される。抗原提示細胞は、取り込んだ抗原をプロセッシング（加工）し、この加工された抗原を主要組織適合性抗原複合体 (MHC) に結合させて抗原提示する。T細胞は、抗原提示細胞により提示された該加工抗原を、その細胞膜表面に有するT細胞受容体 (TcR) とCD3抗原との複合体 (TcR/CD3複合体) を通じて認識することで細胞の活性化（特異性の獲得）のための第1のシグナルを受ける。

## 【0005】

しかしながら、このTcR/CD3複合体を介した第1シグナルだけでは、T細胞の十分な活性化が起こらないだけでなく、その後に受ける如何なる刺激に対しても反応しなくなる不応答状態 (unresponsiveness) またはクローン麻痺 (clonal anergy) と呼ばれる状態に陥る。T細胞が活性化され抗原特異的なT細胞クローニングに分化、増殖するためにはインターロイキン-2 (IL-2) の自己分泌 (オートクリン; autocrine) が必要であるが、クローン麻痺の状態ではIL-2などが産生されず細胞分裂が起こらないため、T細胞が不活性化された状態となる。即ち、IL-2などのサイトカインの産生を伴うT細胞の活性化には、TcR/CD3複合体を介した第1シグナルに引き続く第2のシグナルを必要とする。この第2のシグナルはコスティミュレイトリーシグナル（副刺激シグナル; costimulatory signal）と呼ばれる。

## 【0006】

T細胞は、T細胞表面上のTcR/CD3複合体とは別の分子を介して抗原提示細胞上のMHCとは別の分子と相互作用（細胞間接着）することによりこの第2のシグナルを受けとり細胞内に伝達する。この第2のシグナルにより細胞のアナジー（クローン麻痺）が回避されるとともに細胞が活性化される。

## 【0007】

抗原提示細胞とT細胞等のリンパ球の間の第2のシグナルの伝達のメカニズムについては未だ詳細に解明されていない部分はあるものの、これまでの研究から、この第2のシグナル伝達には、主にT細胞及び胸腺細胞で発現する細胞表面分子であるCD28 (別名: Tp44、T44、又は9.3抗原) と抗原提示細胞 (マクロファージ)

ジ、单球、樹状細胞など)で発現する細胞表面分子であるCD80(別名:B7-1、B7、BB1、またはB7/BB1)及び同じく抗原提示細胞状の細胞表面分子であるCD86(別名:B7-2またはB70)との間の相互作用(即ち、それらの分子間の結合を介した細胞間接着)が極めて重要であることが明らかにされている。

## 【0008】

さらにこの第2のシグナルによるT細胞の活性化の制御には、該第2のシグナルに依存してその発現が増強されると考えられているCTLA-4(Cytolytic T lymphocyte associated antigen 4)と該CD80(B7-1)及びCD86(B7-2)との間の相互作用(即ち、それらの分子間の結合を介した細胞間接着)も重要な役割を担っていることが実験的に明らかにされてきている。即ち、この第2のシグナルの伝達によるT細胞の活性化の制御には、少なくともCD28とCD80/CD86との間の相互作用、該相互作用に依存すると考えられるCTLA-4の発現の増強、並びにCTLA-4とCD80/CD86との間の相互作用が包含されることが明らかにされてきている。

## 【0009】

CD28は、このT細胞の活性化とアナジーの回避に必要な第2のシグナル(コスティミュレイトリーシグナル)を伝達するコスティミュレイター分子であることが明らかにされている。この分子が抗原提示細胞上のコスティミュレイター分子であるCD80(B7-1)及びCD86(B7-2)と結合すること(換言すれば、それらの分子間の結合を介した細胞間接着)により伝達される第2のシグナルは、Th1型サイトカインのmRNAを安定化させ、その結果T細胞からのIL-2、IFN $\gamma$ 及びTNF $\alpha$ などのTh1型サイトカインを大量の産生を促す。一方、CTLA-4は、TcR/CD3を通じて入る第1シグナルにより発現が誘導されるとともに、CD28とCD80との結合により入る該第2のシグナルによってもその発現が増強されることが知られている。CTLA-4は、それらのシグナルを受けて、CD28より入る第2のシグナルによるT細胞の活性化とは反対にT細胞機能に対して抑制的に働くことが明らかになってきている。

## 【0010】

ヒトのCD28及びCTLA-4は、各々44kD及び41乃至43kDの分子量を有するI型糖蛋白質である。ともに免疫グロブリン様ドメイン1個を有し、免疫グロブリンス

パーファミリーに属し、細胞間接着分子としての機能と細胞内へのシグナル伝達分子としての両方の機能を併せ持った分子である。

## 【0011】

ヒトCD28はジズルフィド結合によりホモ二量体を形成し、一方、CTLA-4は単量体で存在することが示されている。CD28及びCTLA-4の遺伝子の染色体上に位置は、ヒトにおいてはいずれも「2q33」、またマウスにおいては「1C」であり、いずれも4つのエクソンからなる。ヒトのCD28及びCTLA-4は、リーダー配列を含め各々220及び223個のアミノ酸から構成され、両者のアミノ酸相同性は20乃至30%程度である。

## 【0012】

CD28及びCTLA-4のリガンドは、ヒト及びマウスにおいてCD80 (B7-1) 及びCD86 (B7-2) であることが解明されている。CTLA-4は、いずれのリガンドに対してもCD28より親和性が高く、その差は約20倍である。CD28及びCTLA-4のCD80 (B7-1)への結合には、動物種を超えて保存されているアミノ酸配列構造である「MYPP PY (Met-Tyr-Pro-Pro-Tyr)」が重要であることが明らかにされている。また、CD28が刺激を受けると、その細胞内の部分配列「YMNN (Tyr-Met-Asn-Met)」内のリン酸化されたチロシン残基へPI3キナーゼ (phosphoinositide 3 kinase, PI3K) が会合することが示され、CD28はこの「YxxM」構造を介して細胞内シグナル伝達において重要な働きをしていることが示されてきている。また、CTLA-4の細胞内領域にも「YxxM」で表わされる配列、即ち「YVKM (Tyr-Val-Lys-Met)」を有しており、刺激を受けた後、この配列にSYPが会合することが示されている。

## 【0013】

CD28は、胸腺細胞及び末梢血T細胞に限局して発現し、一方CTLA-4は活性化T細胞に特異的に発現することがわかってきている（細胞工学・別冊「接着分子ハンドブック」、秀潤社発行、第93-102頁、1994年； 同誌、第120-136頁； 実験医学・別冊「BIO-SCIENCE用語ライブラリー・免疫」、羊土社発行、第94-98頁、1995年； 実験医学・別冊「BIO SCIENCE用語ライブラリー・細胞内シグナル伝達」、羊土社発行、第58-59頁、1997年； 日本臨床、第55巻、第6号、第2

15-220頁、1997年）。

【0014】

このようにしてT細胞機能の制御（T細胞の活性化及び機能抑制）におけるコスティミュレイター分子（CD28、CD80（B7-1）及びCD86（B7-2）など）並びに運動するCTLA-4などの複数の分子の間の相互作用（換言すれば、それらの分子間の結合を介した細胞間接着）の重要性が提唱されるようになり、それらの分子と疾患との関係の解明、並びにそれらの分子の機能を制御することによる疾患の治療の試みが注目されるようになってきている。

【0015】

前述のように、生体は、生体（自己）にとって異物である抗原に対しては獲得免疫応答システムを作動させるが、自己の生体成分（自己抗原）に対しては免疫応答を示さない免疫寛容を有している。しかしながら、何らかの原因で免疫寛容の破綻が起こると、自己抗原に対する免疫応答が起こり前述と同様のメカニズムにより自己抗原反応性T細胞が誘導され免疫異常状態に陥り、種々の自己免疫疾患が惹起される。

【0016】

即ち、生体の免疫システムが正常な状態では、正常組織の無刺激の抗原提示細胞（antigen presenting cell; APC）はコスティミュレイトリーモル子を発現しないため、例え自己抗原に反応する自己抗原反応性T細胞が存在していても、T細胞が不応答状態に陥っているため自己寛容が維持されているが、免疫異常状態においては過剰または継続的なコスティミュレイトリーモル子の発現以上により自己抗原反応性T細胞が活性化され自己免疫疾患が惹起されるという可能性が提示されている。

このような観点から近年、コスティミュレイトリーシグナルの伝達、例えば前述のCD28/CTLA-4-CD80/CD86の間のシグナル伝達を調節することにより種々の自己免疫性疾患の治療の試みが多数なされてきている。

しかしながら、そのような治療の試みがなされる一方で、コスティミュレイターモル子及び関連する分子との間の相互作用（換言すれば、それらの分子間の結合を介した細胞間接着）によるT細胞の活性化のメカニズムの詳細な解明は未だな

されておらず、またこのメカニズムには未だ同定されていない他の分子が関与する可能性も残っている。

## 【0017】

最近本発明者らは、前記「CD28」や「CTLA-4」と同様に、T細胞等のリンパ球の活性化に必須な第2のシグナル（コスティミュレイトリーシグナル）の伝達、並びに該シグナルに連動して活性化T細胞等の活性化リンパ球の機能制御を行う分子であると考えられる新規な哺乳動物（ヒト、マウス及びラット）由来の細胞膜表面分子を同定及び単離することに成功し、その分子を「JTT-1抗原」または「JTT-2抗原」と命名した（日本国特許出願公開11-29599号公報；国際特許出願公開W098/38216号；Int. Immunology, Vol.12, No.1, p.51-55, 2000）。なお、後に本発明者らはこれらの分子をAILIM (activation inducible lymphocyte imm unomodulatory molecule) と改名した。

本発明者らによるこれまでの研究から、この新分子AILIMが下記のような知見が得られている。

## 【0018】

(1) T細胞の活性化に重要なコスティミュレイトリーシグナルを細胞間接着を介して伝達するT細胞等のリンパ球の細胞表面分子である「CD28」並びに該シグナルに連動して活性化T細胞等の活性化リンパ球の機能制御を行うT細胞等のリンパ球の細胞表面分子である「CTLA-4」と下記のような類似性を有する。

- ①システィン残基を含む20以上のアミノ酸残基が良く保存されている。
- ②リガンド結合領域として必須なプロリン残基の連続する配列「Pro-Pro-Pro (PPP)」が細胞外領域に保存されている。
- ③シグナル伝達領域として必須な配列「Tyr-Xaa-Xaa-Met (YxxM) (Xaa及びxは任意のアミノ酸を意味する。)」が細胞内領域に保存されている。
- ④「マウスAILIM（マウスJTT-1抗原）」をコードする遺伝子のマウス染色体上での位置は、マウスの「CD28」及び「CTLA-4」の位置と同く、「1C3」である。

## 【0019】

- (2) 細胞間接着を媒介する機能を有する「CD28」及び「CTLA-4」と同様に、「

AILIM (JTT-1抗原)」は胸腺細胞、ConAなどのマイトジエンで刺激したリンパ芽球及び胸腺腫細胞の細胞間接着を媒介する能力を有する。

(3) AILIMは、少なくとも胸腺細胞、ConAなどのマイトジエンで刺激したリンパ芽球細胞（活性化Tリンパ芽球細胞や活性化Bリンパ芽球細胞）、末梢血リンパ球及び胸腺腫細胞で強く発現する。

【0020】

(4) AILIM (JTT-1抗原)に対する抗体は、ヒト末梢血リンパ球を有意に増殖させ、またその増殖は、T細胞の活性化に必須な抗原提示細胞からの第1のシグナルを受け取るT細胞上のTcR/CD3複合体を構成するCD3に対するモノクローナル抗体を共存させることによりさらに高い増殖を誘導する。

(5) AILIM (JTT-1抗原)に対する抗体を、実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE)に投与することにより、その病状が抑制がされる。

(6) AILIM (JTT-1抗原)に対する抗体を、糸球体基底膜 (GBM) 腎炎のモデルラットに投与することにより、その病状が抑制がされる。

【0021】

本発明者らによるAILIMの同定及び性状解析の報告より後になって、クロチエク (Kroczek) らのグループにより、ヒト由来のAILIMと同一の分子であるICOS (inducible co-stimulator) または8F4と命名した分子の同定の報告がなされている (Nature, Vol.397, p.263-266, 1999、及び国際特許出願公開W099/15553号)

AILIM (別名: JTT-1抗原、JTT-2抗原、ICOS、または8F4)については、上述の報告があるのみであり、その生物学的機能並びに疾患との関わりについては未だ詳細に解明されていない。

【0022】

一方、極最近になって、この副刺激伝達分子AILIMと相互作用するリガンドと考えられるB7h、B7RP-1、GL50あるいはLICOSと称される新規分子も同定されている (Nature, Vol.402, No.6763, p.827-832, 1999; Nature Medicine, Vol.5, No.12, p.1365-1369, 1999; J. Immunology, Vol.164, p.1653-1657, 2000; Cur. Biol., Vol.10, No.6, p.333-336, 2000)。

## 【0023】

これら2種類の新規な分子、即ち、AILIM (ICOS) とB7RP-1 (B7h, GL50, LICOS) の同定により、上述したT細胞等のリンパ球の活性化及び活性化T細胞の機能制御に必須であるコスティミュレイトリーシグナルの伝達経路には、これまで知られていたCD28とCD80(B7-1)/CD86(B7-2)との間のシグナル伝達経路、及びCTLA-4とCD80(B7-1)/CD86(B7-2)との間のシグナル伝達経路である第一及び第二の経路の他にAILIM (ICOS) とB7RP-1 (B7h, GL50, LICOS) との相互作用による新しい第三の経路があることが判明することとなった。

この新しい2つの分子の各々の生物学的機能、該分子による第三のコスティミュレイトリーシグナル伝達によるT細胞等のリンパ球の機能制御、並びに該新規なシグナル伝達と疾患との関連性については、目下精力的に研究が進められているところである。

## 【0024】

## 【発明が解決しようとする課題】

即ち、本発明は、前記「CD28」や「CTLA-4」と同様に、T細胞等のリンパ球の活性化に必須な第2のシグナル（コスティミュレイトリーシグナル）の伝達、並びに該シグナルに連動して活性化T細胞等の活性化リンパ球の機能制御を行う分子であると考えられる新規分子AILIMの生物学的機能並びにAILIMの発現と疾患との関わりを明らかにするとともに、該AILIMの生物学的機能を医学及び薬学的手法（例えば、低分子化合物及び抗体等の薬剤）により制御することによりAILIMの発現の状態に依存する種々の疾患の発症を抑制し、または該疾患を治療する方法及び薬剤を提供することを目的とする。

## 【0025】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、哺乳動物のAILIMの生物学的機能、AILIMの種々細胞での発現の状態、及びAILIMの発現と疾患との関連性に関して、鋭意研究を重ねた結果、上述したこれまでに得られているAILIMに関する知見に加えて、さらに下記知見を見出し本発明を完成するに到った。

## 【0026】

(I) 正常マウスのリンパ組織の一つである胸腺のT細胞においては、CD3の発現の高い細胞で同様にAILIMの高い発現が見られ、両者の発現は相関性が認められる。一方、対照的に、コスティミュレイトリー分子であるCD28の発現はCD3の発現が高いほど低下していた。マウス正常胸腺T細胞においては、AILIMの発現とCD28の発現は相反する動態を示した。正常マウス胸腺由来T細胞においては、CD4陰性CD8陰性T細胞では、AILIM及びCD28とともにその発現が認められない。正常マウス胸腺由来T細胞においては、CD28の発現は、CD4陽性CD8陽性T細胞で最大となり、その後の細胞分化を経たCD4陰性CD8陽性T細胞またはCD4陽性CD8陰性T細胞においてその発現が減少する。一方、正常マウス胸腺細胞においては、AILIMの発現は、CD4陽性CD8陽性T細胞では僅かしか認められないものの、その後の細胞分化を経たCD4陰性CD8陽性T細胞またはCD4陽性CD8陰性T細胞で高い発現が認められる。正常マウス胸腺T細胞におけるAILIMの発現は、CD3だけでなくCD4及びCD8の発現との相関性の点においてもCD28の発現とは異なるものである。

## 【0027】

(II) 正常マウスのリンパ組織の一つである脾臓及びリンパ節のT細胞におけるAILIMの発現は、マウス胸腺由来T細胞での発現と比べ僅かであり、CD4陽性T細胞の極少数（CD4陽性T細胞の約1乃至3%）においてAILIMの発現が認められる。

## 【0028】

(III) *P.acnes* (*Propionibacterium acnes*) 及びLPS (*Lipopolysaccharide*) を投与することにより誘導したマウス肝炎モデルの肝臓組織由来T細胞（单核細胞）においては、AILIMの顕著な発現が認められる。その発現は正常マウス脾臓由来のCD4陽性細胞またはリンパ節由来T細胞でのAILIMの発現に比べ著しく高いものである。

## 【0029】

(IV) 健常人の末梢血由来細胞においては、AILIM陽性細胞のほとんどがCD4陽性CD8陰性細胞であり、AILIM陽性細胞のほとんどがT細胞である。健常人末梢血由来には、僅かでではあるがB細胞においてもAILIMを発現が認められる。

(V) 関節リウマチ (RA) 患者の関節腔液中の関節組織浸潤T細胞 (CD4陽性T細

胞及びCD4陰性T細胞)においては、同患者の末梢血中のT細胞及び健常人の末梢血中のT細胞のいずれに比べても、有意に高いAILIMの発現が認められる。

## 【0030】

(VI) 変形性関節症(OA) 患者の関節腔液中のCD4陽性T細胞においても、AILIM陽性細胞の比率が有意に上昇している。また、進行性全身性硬化症(PSS) 患者のCD4陽性T細胞においてもAILIM陽性細胞の比率が有意に上昇している。

(VII) マウスリンパ組織由来のT細胞においては、抗CD3抗体、コンカナバリンA(Concanavalin A; ConA)、またはPMA(phorbol myristate acetate)とIonophoreで刺激すると約3乃至6時間後にAILIMの発現の上昇が認められ、刺激後約12時間で最大のAILIMの発現が認められる。刺激から約24時間以降においてもAILIMの高い発現が認めら、その発現は、約48時間後でも同程度の発現が維持される。

## 【0031】

(VIII) ヒト末梢血T細胞(CD4陽性T細胞及びCD8陽性T細胞)をPMA及びIonophoreで活性化すると、刺激後約8時間後にAILIMの高い発現が認められる。また、ヒト末梢血T細胞においては、抗CD3抗体及び抗AILIM抗体、または抗CD3抗体及び抗CD28抗体のいずれの刺激によってもAILIMの高い発現が誘導される。

(IX) AILIMは、Th2タイプのサイトカイン産生の性状を有する株化T細胞(D10, MS202, CD28KO, EL-4など)でコンスティティーティブ(constitutive)な発現が認められる。また、それらの細胞株でのAILIMの発現は、CD28の発現と同等またはそれ以上に高い発現である。

## 【0032】

(X) 正常マウス及びラットの脾臓または胸腺由来のT細胞または健常人の末梢血由来のT細胞を、本発明を構成する抗AILIM抗体及び抗CD3抗体の両方をコーティングしたプレート中で培養すると、当該T細胞からのサイトカイン(IFN $\gamma$ 、IL-4、TNF $\alpha$ 、IL-2、IL-10)の産生及びT細胞の増殖が誘導される。

(XI) ConAまたはPMAで刺激した末梢血由来T細胞を、本発明を構成する抗AILIM抗体及び抗CD3抗体の両方をコーティングしたプレート中で培養すると、当該T細胞からのサイトカインの産生及び細胞増殖が促進される。また、この結果は

、ConAまたはPMAで刺激した末梢血由来T細胞を、抗CD28抗体及び抗CD3抗体の両方をコーティングしたプレート中で培養した場合の結果と同等である。

## 【0033】

(XII) 正常脾臓及び胸腺の各々から単離した胸腺細胞及び脾臓細胞（各々粘着性細胞を除去）を抗CD3抗体をコーティングしたプレート中で培養することによりT細胞反応を惹起したT細胞に、本発明を構成する抗AILIM抗体を添加すると、該T細胞からのサイトカイン（例えば、インターフェロン $\gamma$ （IFN- $\gamma$ ）、インターロイキン4（IL-4）など）の産生が抑制されるとともに、該T細胞の増殖が抑制される。また、該抗AILIM抗体によるT細胞反応（前記サイトカイン産生、細胞増殖など）の抑制は、抗体の濃度に依存するものである。一方、抗AILIM抗体の代わりに抗CD28抗体を加える場合には、抗AILIM抗体を用いた場合の結果を逆に該T細胞反応が増強される。

## 【0034】

(XIII) *P.acnes* (*Propionibacterium acnes*) 及びLPS (*Lipopolysaccharide*) を投与することにより誘導した肝炎モデル動物に、本発明を構成する抗AILIM抗体を投与すると、抗体濃度依存的に血中のIFN- $\gamma$ の上昇が有意に抑制されるとともに、GOT/GPTの上昇が有意に抑制される。

(XIV) 結核死菌を投与することによる誘導した関節炎モデル動物に、本発明を構成する抗AILIM抗体を投与すると、抗体濃度依存的に足腫れが有意に抑制されるとともに、関節炎の種々のパラメーターの上昇が有意に抑制される。

## 【0035】

(XV) 移植片対宿主病 (graft versus host disease; GVHD) のモデル動物に、本発明を構成する抗AILIM抗体を投与すると、移植片対宿主反応 (GVH reaction) の産物であるIgG及びIgEの産生が有意に抑制されるとともに、自己抗体値の指標である抗dsDNA抗体の産生の上昇が有意に抑制される。

(XVI) 外来抗原としてのヒツジ赤血球 (sheep red blood cell; SRBC) を感作することにより誘導した過剰な外来抗原に対する抗体産生を起こすモデル動物に、本発明を構成する抗AILIM抗体を投与（感作直後または数日後）すると、外来抗原である該SRBCに対する抗体の産生の上昇が有意に抑制される。また、その

抑制効果は、CTLA4-Igを投与した場合の抑制効果よりも高いものである。

(XVII) 外来抗原としてのNP-KLHを感作することにより誘導した過剰な外来抗原に対する抗体産生を起こすモデル動物に、本発明を構成する抗AILIM抗体を投与（感作直後または数日後）すると、外来抗原である該NP-KHに対する抗体の產生の上昇が有意に抑制される。

(XVIII) 抗AILIM抗体が、異なる健常人ドナー由来の末梢血単核球（PBMC）とT細胞とのアロジエニック混合リンパ球反応（MLR）におけるT細胞の細胞増殖を有意に抑制する。

#### 【0036】

本発明の医薬組成物は、AILIMを発現する細胞へのAILIMを介するコスティミュレイトリーシグナル（副刺激シグナル）の伝達が関与する種々の生体反応（例えば、AILIMを発現する細胞の細胞増殖、AILIMを発現する細胞によるサイトカインの產生、AILIMを発現する細胞の免疫細胞溶解（immune cytosis）若しくは細胞死（apoptosis）、及びAILIMを発現する細胞に対する抗体依存性細胞障害を誘導する活性など）を制御するための医薬品として、及び／または該AILIMを介するシグナル伝達が関与する種々の疾患の発症及び／または進行を抑制、阻止し、該疾患を治療または予防するための医薬品として有用である。

#### 【0037】

具体的には、本発明の医薬組成物は、AILIM発現細胞の増殖の制御（抑制または促進）またはAILIM発現細胞によるサイトカイン（例えば、インターフェロン $\gamma$ またはインターロイキン4など）の產生を制御（抑制または促進）することが可能であり、AILIMを介するシグナル伝達が関与する様々な生理現象により惹起される種々の病的状態の抑制、及び種々の疾患の治療または予防を可能にする。

本発明の医薬組成物を用いることにより、例えば、関節症（例えば、関節リウマチ（rheumatoid arthritis; RA）、変形性関節症（osteoarthritis; OA））、炎症（例えば、肝炎）、移植片対宿主反応（graft versus host reaction; GVH reaction）、移植片対宿主病（graft versus host disease; GVHD）、組織若しくは臓器の移植に伴う免疫拒絶反応、外来抗原若しくは自己抗原により惹起される免疫反応（例えば、該抗原に対する抗体の產生、細胞増殖、サイトカインの産

生など)を抑制、予防及び/または治療することが可能である。

【0038】

また、本発明の医薬組成物は、抗炎症薬としての種々のステロイド剤が適用されているいろいろな任意の炎症の治療または予防に適用することが可能である。

本発明の医薬組成物の適用が可能な炎症性疾患としては、例えば、種々の関節炎(関節リウマチ、変形性関節症など)に伴う炎症、肺炎、肝炎(ウイルス性の肝炎を含む)、感染症に伴う炎症、炎症性腸疾患、腸炎、腎炎(糸球体腎炎、腎線維症に伴う炎症)、胃炎、血管炎、肺炎、腹膜炎、気管支炎、心筋炎、脳炎、虚血後再灌流障害(心筋虚血再灌流障害など)における炎症、組織や臓器の移植後免疫拒絶に起因する炎症、火傷、種々の皮膚の炎症(乾癬、アレルギー性接触性皮膚炎、慢性炎症性皮膚疾患である扁平苔癬など)、多発性臓器障害における炎症、PTCAやPTCRの術後における炎症、及び動脈硬化症に伴う炎症、自己免疫性甲状腺炎などが挙げられる。

【0039】

即ち、本発明は、下記(1)乃至(32)に記載されるとおりの発明である。

(1) AILIMを介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる関節症を抑制、治療または予防するための医薬組成物。

(2) 該物質が、AILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIM発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質であることを特徴とする前記(1)に記載の医薬組成物。

(3) 該サイトカインが、Th1タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ であるか、またはTh2タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン4であることを特徴とする前記(1)または前記(2)に記載の医薬組成物。

(4) 該関節症が、関節リウマチであることを特徴とする前記(1)乃至前記(4)のいずれかに記載の医薬組成物。

(5) 該関節症が、変形性関節症であることを特徴とする前記(1)乃至前記(3)のいずれかに記載の医薬組成物。

(6) 該物質が、蛋白性物質であることを特徴とする前記(1)乃至前記(5)のいずれかに記載の医薬組成物。

(7) 該蛋白性物質が、下記群から選ばれるいずれかであることを特徴とする前記(6)に記載の医薬組成物：

- a ) AILIMに結合する抗体またはその一部；
- b ) AILIMの細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド；
- c ) AILIMの細胞外領域の全部または一部と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチド；及び
- d ) AILIMに結合するポリペプチド。

(8) 該物質が、非蛋白性物質であることを特徴とする前記(1)乃至前記(5)のいずれかに記載の医薬組成物。

(9) 該非蛋白性物質が、DNA、RNAまたは化学的に合成された化合物であることを特徴とする前記(8)に記載の医薬組成物。

(10) AILIMを介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる炎症を抑制、治療または予防するための医薬組成物。

(11) 該物質が、AILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIM発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質であることを特徴とする前記(10)に記載の医薬組成物。

(12) 該サイトカインが、Th1タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ であるか、またはTh2タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン4であることを特徴とする前記(11)に記載の医薬組成物。

(13) 該炎症が、肝炎であることを特徴とする前記(10)乃至前記(12)のいずれかに記載の医薬組成物。

(14) 該物質が、蛋白性物質であることを特徴とする前記(10)乃至前記(13)のいずれかに記載の医薬組成物。

(15) 該蛋白性物質が、下記群から選ばれるいずれかであることを特徴とする前記(14)に記載の医薬組成物：

- a) AILIMに結合する抗体またはその一部；
- b) AILIMの細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド；
- c) AILIMの細胞外領域の全部または一部と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチド；及び
- d) AILIMに結合するポリペプチド。

(16) 該物質が、非蛋白性物質であることを特徴とする前記(10)乃至前記(13)のいずれかに記載の医薬組成物。

(17) 該非蛋白性物質がDNA、RNAまたは化学的に合成された化合物であることを特徴とする前記(16)に記載の医薬組成物。

(18) AILIMを介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質及び薬学的に許容され得る担体を含んでなり、移植片対宿主反応、移植片対宿主反応または組織若しくは臓器の移植に伴う免疫拒絶反応を抑制、治療または予防するための医薬組成物。

(19) 該物質が、AILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIM発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質であることを特徴とする前記(18)に記載の医薬組成物。

(20) 該サイトカインが、Th1タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ であるか、またはTh2タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン4であることを特徴とする前記(19)に記載の医薬組成物。

(21) 該物質が、蛋白性物質であることを特徴とする前記(18)乃至前記(20)のいずれかに記載の医薬組成物。

(22) 該蛋白性物質が、下記群から選ばれるいずれかであることを特徴とする前記(21)に記載の医薬組成物：

- a) AILIMに結合する抗体またはその一部；
- b) AILIMの細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド；
- c) AILIMの細胞外領域の全部または一部と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチド；及び
- d) AILIMに結合するポリペプチド。

(23) 該物質が、非蛋白性物質であることを特徴とする前記(18)乃至前記(20)のいずれかに記載の医薬組成物。

(24) 該非蛋白性物質が、DNA、RNAまたは化学的に合成された化合物であることを特徴とする前記(23)に記載の医薬組成物。

(25) AILIMを介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質及び薬学的に許容され得る担体を含んでなり、外来抗原または自己抗原により惹起される免疫反応を抑制するための医薬組成物。

(26) 該免疫反応が、該抗原に対する抗体の產生、細胞増殖、またはサイトカインの產生であることを特徴とする前記(25)に記載の医薬組成物。

(27) 該物質が、AILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIM発現細胞によるサイトカインの產生を抑制する活性を有する物質であることを特徴とする前記(25)または前記(26)に記載の医薬組成物。

(28) 該サイトカインが、Th1タイプのT細胞が產生するサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ であるか、またはTh2タイプのT細胞が產生するサイトカインであるインターロイキン4であることを特徴とする前記(27)に記載の医薬組成物。

(29) 該物質が、蛋白性物質であることを特徴とする前記(25)乃至前記(28)のいずれかに記載の医薬組成物。

(30) 該蛋白性物質が、下記群から選ばれるいずれかであることを特徴とする前記(29)に記載の医薬組成物：

- a) AILIMに結合する抗体またはその一部；
- b) AILIMの細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド；
- c) AILIMの細胞外領域の全部または一部と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチド；及び
- d) AILIMに結合するポリペプチド。

(31) 該物質が、非蛋白性物質であることを特徴とする前記(25)乃至前記(28)のいずれかに記載の医薬組成物。

(32) 該非蛋白性物質が、DNA、RNAまたは化学的に合成された化合物であることを特徴とする前記(31)に記載の医薬組成物。

## 【0040】

## 【発明の実施の形態】

以下、本発明で用いられる抗体の一般的製造方法、並びに本発明で用いる語句の意味を明らかにすることにより、本発明を詳細に説明する。

本発明における「哺乳動物」とは、ヒト、ウシ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、及びモルモット等を意味し、好ましくは、ヒト、ウシ、ラット、マウスまたはハムスターであり、特に好ましくは、ヒトである。

## 【0041】

本発明における「AILIM」とは、「activation inducible lymphocyte immunomodulatory molecule」の略称である。このAILIMは、最近本発明者らが同定、単離し、日本国特許出願公開平11-29599号公報（平成10年特許出願第62217号）及び対応する国際特許出願公開W098/38216号公報（国際特許出願番号PCT/JP98/00837）中において報告した「JTT-1抗原」または「JTT-2抗原」と命名した哺乳動物由来の新規細胞膜表面分子を意味する。

具体的には、上記特許出願公開公報において、配列番号1に記載されるアミノ酸配列を有するヒトAILIM（ヒトJTT-1抗原）、配列番号4または配列番号6のいずれかに記載されるアミノ酸配列を有するラットAILIM（ラットJTT-1抗原）並びに配列番号5に記載されるアミノ酸配列を有するマウスAILIM（マウスJTT-1抗原）を意味する。

## 【0042】

ヒトAILIMと全く同一のヒト由来分子について、クロチェック（Kroczek）らのグループが、本発明者らによる前記2つの特許出願の公開公報の公開日より後に公開された2つの文献中で報告している。彼らはそのヒト由来分子を、ICOS（inducible co-stimulator）または8F4と命名している（国際特許出願公開W099/15553号公報、及びNature, Vol.397, p.263-266, 1999）。当該ICOSまたは8F4と命名されたヒト由来の分子もヒトAILIMと同一分子として本願に取り入れられる。

## 【0043】

また、本発明で言う「AILIM」には、該既報の文献中に記載された各々の哺乳動物のAILIMのアミノ酸配列、特に好ましくはヒトAILIMのアミノ酸配列（日本国

特許出願公開平11-29599号公報及び対応する国際特許出願公開W098/38216号公報に記載される配列番号2に記載されるアミノ酸配列)と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドも包含される。

## 【0044】

ここで「実質的に同一のアミノ酸配列を有する」とは、該既報のアミノ酸配列を含むポリペプチドと実質的に同等の生物学的性質を有する限り、該アミノ酸配列中の複数個のアミノ酸、好ましくは1乃至10個のアミノ酸、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸が置換、欠失及び/または修飾されているアミノ酸配列を有するポリペプチド、並びに該アミノ酸配列に、複数個のアミノ酸、好ましくは1乃至10個のアミノ酸、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドも本願発明の「AILIM」の範囲に包含されることを意味する。

そのようなアミノ酸の置換、欠失、または挿入は常法に従って行うことができる(実験医学別冊・「遺伝子工学ハンドブック」(1992)など)。

## 【0045】

例えば、合成オリゴヌクレオチド指定突然変異導入法(gapped duplex)法、亜硝酸あるいは亜硫酸処理によってランダムに点突然変異を導入する方法、Ba131酵素等により欠失変異体を作製する方法、カセット変異法、リンカースキヤニング法、ミスインコーポレーション法、ミスマッチプライマー法、DNAセグメント合成法などを挙げることができる。

## 【0046】

合成オリゴヌクレオチド指定突然変異導入(gapped duplex)法は、例えば下記のように行うことができる。アンバー変異をもつM13ファージベクターに変異誘起を希望する領域をクローニングし、一本鎖ファージDNAを調製する。アンバー変異をもたないM13ベクターのRFIDNAを制限酵素処理により線状とし、上記の一本鎖ファージDNAと混合して変性後、アニールさせ、「gapped duplex DNA」を形成させる。これに変異を導入した合成オリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせ、DNAポリメラーゼとDNAリガーゼの反応により閉環状2本鎖DNAとする。このDNAをミスマッチ修飾能が欠損している大腸菌mutS株にトランスフェクションし、

増殖したファージをサプレッサー機能のない大腸菌に感染させ、アンバー変異を持たないファージだけを選択する。

【0047】

また、亜硝酸による点突然変異を導入する方法は、例えば下記のような原理を利用する。DNAを亜硝酸処理すると塩基が脱アミノ化されて、アデニンはヒポキサンチンに、シトシンはウラシルに、グアニンはキサンチンになる。脱アミノ化されたDNAを細胞に導入すると、DNA複製時にヒポキサンチンはシトシンと、ウラシルはアデニンとキサンチンはチミンと塩基対を形成するため、「A:T」が「G:C」へ、「G:C」が「A:T」へと置換する。実際には亜硝酸処理した一本鎖DNA断片を「gapped duplex DNA」にハイブリダイズさせ、以下、合成オリゴヌクレオチド指定突然変異導入（gapped duplex）法と同様に操作して変異株を分離すればよい。

【0048】

本発明における「マイトイジェン」とは、分裂促進剤とも呼ばれ、細胞分裂を誘起する物質を指す。免疫学的には、抗原非特異的（ポリクローナル）にリンパ球を幼弱化し分裂を誘起させるものを意味する。例えば、PHAやPWMなどのレクチン、コンカナバリンA（Concanavalin A; ConA）、リポ多糖、ストレプトリシンS、抗リンパ球抗体などが挙げられる。コンカナバリンAやPHAは、Tリンパ球のみに作用し、リポ多糖はBリンパ球のみに作用し、PWMは両リンパ球に作用することが知られている。

【0049】

本願明細書中で用いられる「リンパ芽球細胞」なる用語は、大リンパ球、リンホblast（lymphoblast）あるいは免疫芽細胞とも呼ばれ、リンパ性組織（リンパ節、脾臓、胸腺、骨髓、リンパ管、扁桃腺など）や血液中に存在するリンパ球の大リンパ球に属するリンパ球を指す。

【0050】

本願明細書中で用いられる「活性化リンパ球」なる用語は、例えば下記のようなリンパ球を意味するがこの限りではない。例えば、何らかの刺激により活性化されたリンパ球を指す。リンパ球は、T細胞、B細胞、およびナチュラルキラー細

胞に分類され、さらにT細胞についてはCD4陽性細胞とCD8陽性細胞に分類することができる。従って、本発明で言う「活性化リンパ球」には、主に活性化T細胞、活性化B細胞、および活性化ナチュラルキラー細胞が含まれ、さらに活性化T細胞には活性化CD4陽性細胞と活性化CD8陽性細胞が含まれる。

## 【0051】

CD4陽性T細胞は、抗原提供細胞によって提示された抗原に反応すると、いろいろなサイトカイン（IFN $\gamma$ 、IL-4など）を分泌し、それらのサイトカインに対するレセプターなどが新たに発現し、細胞自身も大きくなり、分裂を始め、増殖して活性化される。活性化CD4陽性T細胞とは、このような状態のCD4陽性T細胞を指す。

## 【0052】

CD8陽性T細胞は、抗原に反応するとIL-2Rを発現し、それにIL-2が作用すると細胞障害性をもつCTLに分化し、次に同じ抗原ペプチド／MHCクラスI複合体に出会った時にその標的細胞を破壊して殺すようになる。CD8陽性T細胞がCTLに分化すると、細胞質内に顆粒が増加していく。この顆粒の中にはいろいろな高分子タンパク質が含まれており、パーフォリンはその代表である。パーフォリンは補体の第5-9成分で構成されるMACによく似ており、標的細胞の細胞膜に穴を開ける作用がある。その他、セリンプロテアーゼやLT、プロテオグリカン（proteoglycan）なども含まれている。また、CTLに分化して抗原刺激を受けるとIFN $\gamma$ 、LT、TNFあるいはIL-2などのリソフォカインも分泌する。活性化CD8陽性T細胞とは、このような状態のCD8陽性T細胞を指す。

## 【0053】

T細胞は汎血球凝集素（植物凝集素、PHA）やコンカナバリンA（Con A）に反応して芽球化現象を示すが、このような状態のT細胞も活性化T細胞に含まれる。

## 【0054】

B細胞では、B7分子を発現し、TCRとともに表面のCD28を刺激してそのヘルパーT細胞を活性化し、CD40Lを発現させたり、リソフォカインを産生したりし、刺激を受けて細胞が大きくなったり、増殖を起こすなどの変化が見られる。活性化B細胞とは、このような状態のB細胞を指し、本発明においては、抗体を分泌する

ようになったB細胞（抗体分泌細胞(antibody-secreting cell)及び形質細胞(plasma cell)）も活性化B細胞に含まれる。

活性化ナチュラルキラー細胞とは、前述のとおり腫瘍細胞やウイルス感染細胞の障害作用を示すナチュラルキラー細胞を指す。なお、本発明においては、コンカナバリンA (Con A) で刺激された胸腺細胞も活性化リンパ球に含まれる。

#### 【0055】

本発明において用いられる「活性化リンパ芽球細胞」には、前記のような「リンパ芽球」が、コンカナバリンAのような前記「マイトジエン」で刺激を受けて活性化されたリンパ芽球が含まれる。

#### 【0056】

本願明細書で場合によって用いられる「静止期リンパ球」なる用語は、前述の活性化リンパ球と対照的に、細胞の活性化のための刺激を受けていない非活性化状態のリンパ球を指す。

#### 【0057】

本発明を構成する「AILIM発現細胞によるサイトカインの産生」における「サイトカイン」とは、AILIMを発現する細胞（特に、T細胞）が産生する任意のサイトカインを意味する。

該T細胞は、Th1タイプのT細胞及びTh2タイプのT細胞が挙げられ、本発明における該サイトカインは、特にそれらTh1タイプのT細胞が産生するサイトカイン及び／またはTh2タイプのT細胞が産生する任意のサイトカインを意味する。

Th1タイプのT細胞が産生するサイトカインとしては、IFN- $\gamma$ 、IL-2、TNF、IL-3などが挙げられ、またTh2タイプのT細胞が産生するサイトカインとしては、IL-3、IL-4、IL-5、IL-10、TNFなどが挙げられる（細胞、Vol.30, No.9, p.343-346, 1998）。

#### 【0058】

本発明を構成する「物質」、具体的には「AILIMを介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質」、さらに具体的には「AILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIM発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質」には、自然界に存在する天然の物質あるいは人工的に調製される任意の物質

を意味する。

ここで、「AILIMを介するシグナル伝達」とは、上述または後述する実施例で詳述するようなAILIMを発現する細胞に任意の表現型の変化（細胞増殖、細胞の活性化、細胞の不活性化、細胞死、及び／またはAILIM発現細胞からの任意のサイトカインの產生能の変化）をもたらすようなAILIMを通じたシグナル伝達を意味する。

#### 【0059】

該「物質」は、「蛋白性物質」と「非蛋白性物質」に大別することができる。

該「蛋白性物質」としては、後述するポリペプチド、抗体（ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体または該モノクローナル抗体の一部）が挙げられる。

該物質が抗体である場合には、好ましくはモノクローナル抗体である。該物質がモノクローナル抗体である場合には、非ヒト哺乳動物由来のモノクローナル抗体だけでなく、後述する組換えキメラモノクローナル抗体、組換えヒト型モノクローナル抗体及びヒトモノクローナル抗体が包含される。

#### 【0060】

該物質が、ポリペプチドである場合には、後述するポリペプチド、該ポリペプチドの断片（オリゴペプチド）、融合ポリペプチド、及びそれらいずれかの化学修飾体が包含される。オリゴペプチドとしては、5乃至30個のアミノ酸、好ましくは5乃至20個のアミノ酸からなるペプチドを挙げることができる。該化学修飾は、生体に投与された場合の血中半減期の増大あるいは経口投与時における消化管での分解に対する耐性若しくは吸収性の増大の目的等の種々の目的に応じて設計することができる。

該ポリペプチドの具体例としては、後述する下記が挙げられる。

- (1) AILIMの細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド；
- (2) AILIMの細胞外領域の全部または一部と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチド；または、
- (3) AILIMに結合するポリペプチド。

#### 【0061】

該「非蛋白性物質」としては、DNA、RNA及び化学的に合成された化合物

が挙げられる。

ここで、「DNA」とは、前述のAILIM(好ましくはヒトAILIM)をコードするDNA(cDNA及びゲノミックDNAを含む)の塩基配列を基に設計されるアンチセンスDNA医薬として有用な「該DNAの部分塩基配列を含むDNAあるいはそれらを化学修飾した化学修飾DNA」を意味する。即ち、該アンチセンスDNAは、AILIMをコードするDNAまたはRNAにハイブリダイズすることにより、該AILIMをコードするDNAのmRNAへの転写あるいは該mRNAの蛋白への翻訳を阻害することができる。

#### 【0062】

ここで、「部分塩基配列」とは、任意の部位における任意の数の塩基からなる部分塩基配列を意味する。該部分塩基配列としては、連続した5乃至100塩基の部分塩基配列が挙げられ、好ましくは、連続した5乃至70塩基の部分塩基配列、さらに好ましくは連続した5乃至50塩基の部分塩基配列、より好ましくは連続した5乃至30塩基の部分塩基配列が挙げられる。

#### 【0063】

また、該DNAをアンチセンス医薬として用いる場合には、該DNAが患者の体内に投与された場合の血中半減期の増大(安定性)、細胞内膜の透過性の増大、あるいは経口投与の場合の消化器官での分解耐性の増大若しくは吸収の増大などの目的のために、該DNAの塩基配列の一部に化学修飾を施すことが可能である。化学修飾としては、例えば、オリゴヌクレオチドの構造中のリン酸結合、リボース、核酸塩基、糖部位、3'及び/または5'末端等の化学修飾が挙げられる。

リン酸結合の修飾としては、1以上の該結合を、ホスホジエステル結合(D-オリゴ)、ホスホロチオエート結合、ホスホジチオエート結合(S-オリゴ)、メチルホスホネート結合(MP-オリゴ)、ホスホロアミデート結合、非リン酸結合及びメチルホスホノチオエート結合のいずれかまたはそれらの組み合わせへの変更を挙げることができる。リボースの修飾としては、2'-フルオロリボースあるいは2'-O-メチルリボースへなどへの変更を挙げることができる。核酸塩基の修飾としては、5-プロピニルウラシルまたは2-アミノアデニンなどへの変更が挙げ

られる。

#### 【0064】

ここで、「RNA」とは、前述のAILIM（好ましくはヒトAILIM）をコードするRNAの塩基配列を基に設計されるアンチセンスRNA医薬として有用な「該RNAの部分塩基配列を含むRNAあるいはそれらを化学修飾した化学修飾RNA」を意味する。該アンチセンスRNAは、AILIMをコードするDNAにハイブリダイズすることにより、該AILIMをコードするDNAまたはRNAにハイブリダイズすることにより、該AILIMをコードするDNAのmRNAへの転写あるいは該mRNAの蛋白への翻訳を阻害することができる。

#### 【0065】

ここで、「部分塩基配列」とは、任意の部位における任意の数の塩基からなる部分塩基配列を意味する。該部分塩基配列としては、連続した5乃至100塩基の部分塩基配列が挙げられ、好ましくは、連続した5乃至70塩基の部分塩基配列、さらに好ましくは連続した5乃至50塩基の部分塩基配列、より好ましくは連続した5乃至30塩基の部分塩基配列が挙げられる。

該アンチセンスRNAは、該RNAが患者の体内に投与された場合の血中半減期の増大、細胞内膜の透過性の増大、あるいは経口投与の場合の消化器官での分解耐性の増大若しくは吸収の増大などの目的のために、該RNAの塩基配列の一部に化学修飾を施すことが可能である。化学修飾としては、例えば、前述のアンチセンスDNAに適用されるような化学修飾を挙げることができる。

#### 【0066】

「化学的に合成された化合物」とは、上述のDNA、RNA及び蛋白性物質を除く任意の化合物であって、分子量約100乃至約1000以下の化合物、好ましくは分子量約100乃至約800の化合物であり、より好ましくは分子量約100乃至約600の化合物を挙げることができる。

#### 【0067】

前記「物質」の定義に包含される「ポリペプチド」とは、AILIM（好ましくはヒトのAILIM）を構成するポリペプチド鎖の一部（断片）を意味し、好ましくはAILIMを構成するポリペプチドの細胞外領域の全部またはその一部を意味する（該

領域は所望応じそのN末端及び／またはC末端に1乃至5のアミノ酸が付加されてもよい。)。

本発明で係るAILIMは、1または2のポリペプチド鎖により構成される細胞膜を貫通する細胞膜貫通分子である。

#### 【0068】

ここで「細胞膜貫通蛋白」とは、多くの受容体あるいは細胞膜表面分子に見られるように、膜の脂質二重層を1回または数回貫通する疎水性ペプチド領域により膜と連結し、全体として細胞外領域(extracellular region)、膜貫通領域(transmembrane region)及び細胞質領域(cytoplasmic region)の3つの主領域から構成される構造をとる蛋白を指す。さらにそのような膜貫通性蛋白は、モノマー(monomer)として、または、同一のアミノ酸配列を有するもう1本の鎖あるいは異なるアミノ酸配列を有する鎖とともにそれぞれホモダイマー(homodimer)、ヘテロダイマー(heterodimer)あるいはオリゴマー(origomer)を形成して存在することにより、各々の受容体や細胞表面分子を構成する。

#### 【0069】

ここで「細胞外領域」とは、前述のような細胞膜膜貫通蛋白の全体構造のうち、該膜蛋白が連結している膜の外界側に存在する部分構造(部分領域)の全部または一部を意味し、換言すれば、膜内に取り込まれている領域(膜貫通領域)及び該膜内の領域に引き続いて細胞質内に存在する領域(細胞内領域)以外の領域の全部または一部を意味する。

#### 【0070】

前述の「蛋白性物質」に包含される「融合ポリペプチド」とは、AILIM(好ましくはヒトのAILIM)を構成するポリペプチドの細胞外領域の全部または一部と「免疫グロブリン(Ig、好ましくはヒトのIg)の重鎖の定常領域の全部または一部」とからなる融合ポリペプチドである。好ましくはAILIMの細胞外領域とヒトIgGの重鎖の定常領域の一部との融合ポリペプチドであり、特に好ましくはAILIMの細胞外領域とヒトIgGの重鎖のヒンジ領域、CH2ドメイン及びCH3ドメインからなる領域(Fc)との融合ポリペプチドである。なお、IgGとしては、IgG1が好ましい。また、AILIMとしては、ヒト、マウスまたはラット(好ましくはヒ

ト) のAILIMが好ましい。

#### 【0071】

ここで「免疫グロブリン（Ig）の重鎖の定常領域の全部または一部」とは、好ましくはヒト由来の免疫グロブリンの重鎖（Heavy Chain, H鎖）の定常領域（Constant region）、Fc領域またはそれらの一部を意味する。該免疫グロブリンは、どのようなクラス及びサブクラスに属する免疫グロブリンであってもよく、具体的には、IgG（IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4）、IgM、IgA（IgA1及びIgA2）、IgD及びIgEを挙げることができる。好ましくは、IgG（IgG1、IgG2、IgG3若しくはIgG4）、またはIgMである。本発明における特に好ましい例としては、ヒト由来のIgG（IgG1、IgG2、IgG3若しくはIgG4）に属する免疫グロブリンである。

#### 【0072】

免疫グロブリンは、2つの相同的な軽鎖（Light Chain, L鎖）と2つの相同的な重鎖（Heavy Chain, H鎖）の4つの鎖が、ジスルフィド結合（S-S結合）で結合したY字形の構造単位を有する。軽鎖は、軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>）及び軽鎖定常領域（C<sub>L</sub>）から構成される。重鎖は、重鎖可変領域（V<sub>H</sub>）と重鎖定常領域（C<sub>H</sub>）から構成される。

#### 【0073】

重鎖定常領域は、クラス（IgG、IgM、IgA、IgD及びIgE）並びにサブクラス（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2）毎に各々固有のアミノ酸配列を有するいくつかのドメインから構成される。

#### 【0074】

IgG（IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4）の重鎖は、N末端から順に、V<sub>H</sub>、CH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメイン及びCH3ドメインから構成される。

#### 【0075】

同様にIgG1の重鎖は、N末端から順に、V<sub>H</sub>、C<sub>γ1</sub>1ドメイン、ヒンジ領域、C<sub>γ1</sub>2ドメイン及びC<sub>γ1</sub>3ドメインから構成される。IgG2の重鎖は、N末端から順に、V<sub>H</sub>、C<sub>γ2</sub>1ドメイン、ヒンジ領域、C<sub>γ2</sub>2ドメイン

及び $C\gamma_2$ 3ドメインから構成される。 $IgG3$ の重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C\gamma_3$ 1ドメイン、ヒンジ領域、 $C\gamma_3$ 2ドメイン及び $C\gamma_3$ 3ドメインから構成される。 $IgG4$ の重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C\gamma_4$ 1ドメイン、ヒンジ領域、 $C\gamma_4$ 2ドメイン及び $C\gamma_4$ 3ドメインから構成される。

## 【0076】

$IgA$ の重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C\alpha$ 1ドメイン、ヒンジ領域、 $C\alpha$ 2ドメイン及び $C\alpha$ 3ドメインから構成される。

## 【0077】

同様に $IgA1$ の重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C\alpha$ 11ドメイン、ヒンジ領域、 $C\alpha_1$ 2ドメイン及び $C\alpha_1$ 3ドメインから構成される。 $IgA2$ の重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C\alpha_2$ 1ドメイン、ヒンジ領域、 $C\alpha_2$ 2ドメイン及び $C\alpha_2$ 3ドメインから構成される。

## 【0078】

$IgD$ の重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C\delta$ 1ドメイン、ヒンジ領域、 $C\delta$ 2ドメイン及び $C\delta$ 3ドメインから構成される。

## 【0079】

$IgM$ の重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C\mu$ 1ドメイン、 $C\mu$ 2ドメイン、 $C\mu$ 3ドメイン及び $C\mu$ 4ドメインから構成され、 $IgG$ 、 $IgA$ 及び $IgD$ に見られるようなヒンジ領域を有しない。

## 【0080】

$IgE$ の重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C\epsilon$ 1ドメイン、 $C\epsilon$ 2ドメイン、 $C\epsilon$ 3ドメイン及び $C\epsilon$ 4ドメインから構成され、 $IgG$ 、 $IgA$ 及び $IgD$ に見られるようなヒンジ領域を有しない。

## 【0081】

さらに、 $IgG$ を例に挙げるならば、 $IgG$ をパパインで処理すると、2つの重鎖を連結させているヒンジ領域中に存在するジスルフィド結合のややN末端側で切断されて、 $V_H$ 及び $C_H$ 1からなる重鎖断片と1つの軽鎖がジスルフィド結合で連結した2つの相同的なF<sub>a</sub>b、並びにヒンジ領域、 $C_H$ 2ドメイン及び $C_H$ 3ドメインからなる2つの相同的な重鎖断片がジスルフィド結合で連結した1つのF<sub>c</sub>

を生ずる（以上、「免疫学イラストレイテッド」、原書第2版、第65～75頁、1992年、南江堂発行、及び「最新医科学の焦点「免疫系の認識機構」」、第4～7頁、1991年、南江堂発行など参照）。

#### 【0082】

即ち、上述の「免疫グロブリンの重鎖の定常領域の一部」とは、上述のような構造的特徴を有する免疫グロブリンの重鎖の定常領域一部を意味し、好ましくは、C1ドメインを欠く定常領域またはFc領域である。具体的には、IgG、IgAまたはIgDの場合には、各々のヒンジ領域、C2ドメイン及びC3ドメインからなる領域が挙げられ、IgMまたはIgEの場合には、各々のC2ドメイン、C3ドメイン及びC4ドメインからなる領域が挙げられる。とりわけ好ましい例としては、ヒト由来のIgG1のFc領域を挙げることができる。

#### 【0083】

上述の融合ポリペプチドは、前述のようなIgG等の免疫グロブリンの定常領域の一部（例えば、Fc）を融合パートナーとして有することから、該免疫グロブリン断片に特異的に結合するというプロテインAの性質を用いたアフィニティカラムクロマトグラフィーを用いることにより該融合ポリペプチドを極めて容易に精製することが可能であるという点で利点を有する。さらに、種々の免疫グロブリンのFcに対する種々の抗体が提供されていることから、該Fcに対する抗体を用いて、該融合ポリペプチドのイムノアッセイを簡便に行うことができる。

#### 【0084】

前記「物質」の定義に包含される「ポリペプチド」には、また「AILIMに結合するポリペプチド」が包含される。

「AILIMに結合するポリペプチド」としては、具体的には、AILIMと相互作用するリガンドである既知のB7h、B7RP-1、GL50あるいはLICOSと称される分子（Nature, Vol.402, No.6763, p.827-832, 1999; Nature Medicine, Vol.5, No.12, p.1365-1369, 1999; J. Immunology, Vol.164, p.1653-1657, 2000; Curr. Biol., Vol.10, No.6, p.333-336, 2000）を構成するポリペプチドの全部または一部を含むポリペプチドが挙げられる。

好ましくは、上記リガンド（B7h、B7RP-1、GL50、LICOS）の細胞外領域の全部

または一部を含むポリペプチド、または該ポリペプチドと免疫グロブリン（好ましくはヒト免疫グロブリン）の重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチドである。ここで、「細胞外領域」及び「免疫グロブリンの重鎖の定常領域」なる用語については、上述と同様の意味を有する。

## 【0085】

上述したポリペプチド、該ポリペプチドの一部（断片）及び融合ポリペプチドは、後述するような遺伝子組換え技術のほか、化学的合成法、細胞培養方法等のような当該技術的分野において知られる公知の方法あるいはその修飾方法を適宜用いることにより製造することができる。

本発明における「抗体」とは、前記で定義した哺乳動物のAILIM（特に好ましくはヒトAILIM）に対するポリクローナル抗体（抗血清）あるいはモノクローナル抗体を意味し、好ましくはモノクローナル抗体である。

具体的には、AILIMに結合しAILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIMに結合しAILIM発現細胞によるインターフェロンγ若しくはインターロイキン4の産生を抑制する活性を有する抗体である。

## 【0086】

本発明の「抗体」は、本発明のAILIMを発現する細胞（天然の細胞、株化細胞、腫瘍細胞など）、AILIMをその細胞表面に高発現するように遺伝子組換技術を用いて作製された形質転換体、AILIMを構成するポリペプチド、該AILIMポリペプチド、またはAILIMの細胞外領域を含む前述の融合ポリペプチドを抗原として用い、該抗原をマウス、ラット、ハムスター、モルモットあるいはウサギ等の哺乳動物に免疫して得られる天然型抗体、遺伝子組換技術を用いて製造され得るキメラ抗体及びヒト型抗体（CDR-grafted抗体）、並びにヒト抗体産生トランスジェニック動物等を用いて製造され得るヒト抗体も包含する。

## 【0087】

モノクローナル抗体には、IgG、IgM、IgA、IgDあるいはIgE等のいずれのアイソタイプを有するモノクローナル抗体もが包含される。好ましくは、IgGまたはIgMである。

## 【0088】

ポリクローナル抗体（抗血清）あるいはモノクローナル抗体は、既存の一般的な製造方法によって製造することができる。即ち、例えば、前述のような抗原を、必要に応じてフロイントアジュvant (Freund's Adjuvant) とともに、哺乳動物、好ましくは、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、ヤギ、ウマあるいはウシ、より好ましくはマウス、ラット、ハムスター、モルモットまたはウサギに免疫する。

## 【0089】

ポリクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た血清から取得することができる。またモノクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た該抗体産生細胞と自己抗体産生能のない骨髄腫系細胞（ミエローマ細胞）からハイブリドーマを調製し、該ハイブリドーマをクローン化し、哺乳動物の免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを選択することによって製造される。

## 【0090】

モノクローナル抗体は、具体的には下記のようにして製造することができる。即ち、前述のような抗原を免疫原とし、該免疫原を、必要に応じてフロイントアジュvant (Freund's Adjuvant) とともに、非ヒト哺乳動物、具体的には、マウス、ラット、ハムスター、モルモットあるいはウサギ、好ましくはマウス、ラットあるいはハムスター（後述するヒト抗体産生トランスジェニックマウスのような他の動物由来の抗体を産生するように作出されたトランスジェニック動物を含む）の皮下内、筋肉内、静脈内、フッドパッド内あるいは腹腔内に1乃至数回注射するかあるいは移植することにより免疫感作を施す。通常、初回免疫から約1乃至14日毎に1乃至4回免疫を行って、最終免疫より約1乃至5日後に免疫感作された該哺乳動物から抗体産生細胞が取得される。免疫を施す回数及び時間的インターバルは、使用する免疫原の性質などにより、適宜変更することができる。

## 【0091】

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの調製は、ケーラー及びミルシュタインらの方法（ネイチャー(Nature)、第256巻、第495～第497頁、

1975年) 及びそれに準じる修飾方法に従って行うことができる。即ち、前述の如く免疫感作された非ヒト哺乳動物から取得される脾臓、リンパ節、骨髄あるいは扁桃等、好ましくは脾臓に含まれる抗体産生細胞と、好ましくはマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物、より好ましくはマウス、ラットまたはヒト由来の自己抗体産生能のないミエローマ細胞との細胞融合させることにより調製される。

## 【0092】

細胞融合に用いられるミエローマ細胞としては、例えばマウス由来ミエローマP3/X63-AG8.653(653)、P3/NSI/1-Ag4-1(NS-1)、P3/X63-Ag8.U1(P3U1)、SP2/0-Ag14(Sp2/0、Sp2)、PAI、F0あるいはBW5147、ラット由来ミエローマ210RCY3-Ag.2.3.、ヒト由来ミエローマU-266AR1、GM1500-6TG-A1-2、UC729-6、CEM-AGR、D1R11あるいはCEM-T15を使用することができる。

## 【0093】

モノクローナル抗体を產生するハイブリドーマクローンのスクリーニングは、ハイブリドーマを、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖の見られたウェルの培養上清の前述の免疫感作で用いた免疫抗原に対する反応性を、例えばRIAやELISA等の酵素免疫測定法によって測定することにより行なうことができる。

## 【0094】

ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の製造は、ハイブリドーマをインビトロ、またはマウス、ラット、モルモット、ハムスターまたはウサギ等、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウスの腹水中等でのインビボで行い、得られた培養上清、または哺乳動物の腹水から単離することにより行なうことができる。

## 【0095】

インビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特性、試験研究の目的及び培養方法等の種々条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持及び保存させ、培養上清中にモノクローナル抗体を產生させるために用いられるような既知栄養培地あるいは既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施

することが可能である。

## 【0096】

基本培地としては、例えば、Ham' F12培地、MCDB153培地あるいは低カルシウムMEM培地等の低カルシウム培地及びMCDB104培地、MEM培地、D-MEM培地、RPMI1640培地、ASF104培地あるいはRD培地等の高カルシウム培地等が挙げられ、該基本培地は、目的に応じて、例えば血清、ホルモン、サイトカイン及び／または種々無機あるいは有機物質等を含有することができる。

## 【0097】

モノクローナル抗体の単離、精製は、上述の培養上清あるいは腹水を、飽和硫酸アンモニウム、ユーグロブリン沈澱法、カプロイン酸法、カプリル酸法、イオノン交換クロマトグラフィー（DEAEまたはDE52等）、抗イムノグロブリンカラムあるいはプロテインAカラム等のアフィニティカラムクロマトグラフィーに供すること等により行うことができる。

## 【0098】

「組換えキメラモノクローナル抗体」は、遺伝子工学的に作製されるモノクローナル抗体であって、具体的には、その可変領域が、非ヒト哺乳動物（マウス、ラット、ハムスターなど）のイムノグロブリン由来の可変領域であり、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするマウス／ヒトキメラモノクローナル抗体等のキメラモノクローナル抗体を意味する。

## 【0099】

ヒトイムノグロブリン由来の定常領域は、IgG（IgG1, IgG2, IgG3, IgG4）、IgM、IgA、IgD及びIgE等のアイソタイプにより各々固有のアミノ酸配列を有するが、組換えキメラモノクローナル抗体の定常領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグロブリンの定常領域であってもよい。好ましくは、ヒトIgGの定常領域である。

## 【0100】

組換えキメラモノクローナル抗体は、例えば以下のようにして製造することができる。しかしながら、そのような製造方法に限定されるものでないことは言うまでもない。

## 【0101】

例えば、マウス／ヒトキメラモノクローナル抗体は、実験医学（臨時増刊号）、第1.6巻、第10号、1988年及び特公平3-73280号公報等を参照しながら作製することができる。即ち、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから単離した該マウスモノクローナル抗体をコードするDNAから取得した活性なV<sub>H</sub>遺伝子（H鎖可変領域をコードする再配列されたVDJ遺伝子）の下流に、ヒトイムノグロムリンをコードするDNAから取得したC<sub>H</sub>遺伝子（H鎖定常領域をコードするC遺伝子）を、また該ハイブリドーマから単離したマウスモノクローナル抗体をコードするDNAから取得した活性なV<sub>L</sub>遺伝子（L鎖可変領域をコードする再配列されたVJ遺伝子）の下流にヒトイムノグロムリンをコードするDNAから取得したC<sub>L</sub>遺伝子（L鎖定常領域をコードするC遺伝子）を、各自発現可能なように配列して1つ又は別々の発現ベクターに挿入し、該発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、該形質転換細胞を培養することにより作製することができる。

## 【0102】

具体的には、まず、マウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから常法によりDNAを抽出後、該DNAを適切な制限酵素（例えばEcoRI、Hind III等）を用いて消化し、電気泳動に付して（例えば0.7%アガロースゲル使用）サザンプロット法を行う。泳動したゲルを例えばエチジウムプロマイド等で染色し、写真撮影後、マーカーの位置を付し、ゲルを2回水洗し、0.25MのHCl溶液に15分間浸す。次いで、0.4NのNaOH溶液に10分間浸し、その間緩やかに振盪する。常法により、フィルターに移し、4時間後フィルターを回収して2×SSCで2回洗浄する。フィルターを十分乾燥した後、ベイキング（75℃、3時間）を行う。ベイキング終了後に、該フィルターを0.1×SSC／0.1%SDS溶液に入れ、65℃で30分間処理する。次いで、3×SSC／0.1%SDS溶液に浸す。得られたフィルターをプレハイブリダイゼーション液と共にビニール袋に入れ、65℃で3～4時間処理する。

## 【0103】

次に、この中に<sup>32</sup>P標識したプローブDNA及びハイブリダイゼーション液

を入れ、65°Cで12時間程度反応させる。ハイブリダイゼーション終了後、適切な塩濃度、反応温度および時間（例えば、2×SSC/0.1%SDS溶液、室温、10分間）のもとで、フィルターを洗う。該フィルターをビニール袋に入れ、2×SSCを少量加え、密封し、オートラジオグラフィーを行う。

#### 【0104】

上記サザンプロット法により、マウスモノクローナル抗体のH鎖及びL鎖を各々コードする再配列されたVDJ遺伝子及びVJ遺伝子を同定する。同定したDNA断片を含む領域をショ糖密度勾配遠心にて分画し、ファージベクター（例えば、Charon 4A、Charon 28、λEMBL3、λEMBL4等）に組み込み、該ファージベクターで大腸菌（例えば、LE392、NM539等）を形質転換し、ゲノムライブラリーを作製する。そのゲノムライブラリーを適當なプローブ（H鎖J遺伝子、L鎖（κ）J遺伝子等）を用いて、例えばベントンディビス法（Science、第196巻、第180～第182頁、1977年）に従って、プラーカハイブリダイゼーションを行い、再配列されたVDJ遺伝子あるいはVJ遺伝子を各々含むポジティブクローンを得る。得られたクローンの制限酵素地図を作製し、塩基配列を決定し、目的とする再配列されたV<sub>H</sub>(VDJ)遺伝子あるいはV<sub>L</sub>(VJ)遺伝子を含む遺伝子が得られていることを確認する。

#### 【0105】

一方、キメラ化に用いるヒトC<sub>H</sub>遺伝子及びヒトC<sub>L</sub>遺伝子を別に単離する。例えば、ヒトIgG1とのキメラ抗体を作製する場合には、C<sub>H</sub>遺伝子であるCγ1遺伝子とC<sub>L</sub>遺伝子であるCκ遺伝子を単離する。これらの遺伝子はマウス免疫グロブリン遺伝子とヒト免疫グロブリン遺伝子の塩基配列の高い相同性を利用してヒトCγ1遺伝子及びヒトCκ遺伝子に相当するマウスCγ1遺伝子及びマウスCκ遺伝子をプローブとして用い、ヒトゲノムライブラリーから単離することによって得ることができる。

#### 【0106】

具体的には、例えば、クローンIg146 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第75巻、第4709～第4713頁、1978年) からの3kbのHind III-BamHI断片とクローンMEP 10 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第78巻、第474～第478頁、1981年) からの6.

8kbのEcoRI断片をプローブとして用い、ヒトのラムダCharon 4A のHae III-Alu Iゲノムライブラリー (Cell、第15巻、第1157～第1174頁、1978年) 中から、ヒトC $\kappa$ 遺伝子を含み、エンハンサー領域を保持しているDNA断片を単離する。また、ヒトC $\gamma$ 1遺伝子は、例えばヒト胎児肝細胞DNAをHind IIIで切断し、アガロースゲル電気泳動で分画した後、5.9kbのバンドをλ788に挿入し、前記のプローブを用いて単離する。

## 【0107】

このようにして単離されたマウスV<sub>H</sub>遺伝子とマウスV<sub>L</sub>遺伝子、及びヒトC<sub>H</sub>遺伝子とヒトC<sub>L</sub>遺伝子を用いて、プロモーター領域及びエンハンサー領域などを考慮しながらマウスV<sub>H</sub>遺伝子の下流にヒトC<sub>H</sub>遺伝子を、またマウスV<sub>L</sub>遺伝子の下流にヒトC<sub>L</sub>遺伝子を、適切な制限酵素及びDNAリガーゼを用いて、例えばpSV2gptあるいはpSV2neo等の発現ベクターに常法に従って組み込む。この際、マウスV<sub>H</sub>遺伝子/ヒトC<sub>H</sub>遺伝子とマウスV<sub>L</sub>遺伝子/ヒトC<sub>L</sub>遺伝子のキメラ遺伝子は、一つの発現ベクターに同時に配置されてもよいし、各々別個の発現ベクターに配置することもできる。

## 【0108】

このようにして作製したキメラ遺伝子挿入発現ベクターを、例えばP3X63·Ag8·653細胞あるいはSP210細胞といった、自らは抗体を産生していない骨髄腫細胞にプロトプラスト融合法、DEAE-デキストラン法、リン酸カルシウム法あるいは電気穿孔法等により導入する。形質転換細胞は、発現ベクターに導入された薬物耐性遺伝子に対応する薬物含有培地中での培養により選別し、目的とするキメラモノクローナル抗体産生細胞を取得する。

このようにして選別された抗体産生細胞の培養上清中から目的のキメラモノクローナル抗体を取得する。

## 【0109】

「ヒト型モノクローナル抗体 (CDR-grafted抗体)」は、遺伝子工学的に作製されるモノクローナル抗体であって、具体的には、その超可変領域の相補性決定領域の一部または全部が非ヒト哺乳動物（マウス、ラット、ハムスターなど）のモノクローナル抗体に由来する超可変領域の相補性決定領域であり、その可変領

域の枠組領域がヒトイムノグロブリン由来の可変領域の枠組領域であり、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするヒト型モノクローナル抗体を意味する。

## 【0110】

ここで、超可変領域の相補性決定領域とは、抗体の可変領域中の超可変領域に存在し、抗原と相補的に直接結合する部位である3つの領域 (Complementarity-determining residue ; CDR1、CDR2、CDR3) を指し、また可変領域 の枠組領域とは、該3つ相補性決定領域の前後に介在する比較的保存された4つの領域 (Framework region ; FR1、FR2、FR3、FR4) を指す。

換言すれば、非ヒト哺乳動物由来のモノクローナル抗体の超可変領域の相補性決定領域の一部または全部以外の全ての領域が、ヒトイムノグロブリンの対応領域と置き代わったモノクローナル抗体を意味する。

## 【0111】

ヒトイムノグロブリン由来の定常領域は、IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) 、IgM、IgA、IgD及びIgE等のアイソタイプにより各々固有のアミノ酸配列を有するが、本発明においては、該ヒト型モノクローナル抗体の定常領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグロブリンの定常領域であってもよい。好ましくは、ヒトIgGの定常領域である。また、ヒトイムノグロブリン由来の可変領域の枠組領域についても限定されるものではない。

## 【0112】

ヒト型モノクローナル抗体は、例えば以下のようにして製造することができる。しかしながら、そのような製造方法に限定されるものでないことは言うまでもない。

例えば、マウスモノクローナル抗体に由来する組換ヒト型モノクローナル抗体は、特表平4-506458号公報及び特開昭62-296890号公報等を参照して、遺伝子工学的に作製することができる。即ち、マウスモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマから、少なくとも1つのマウスH鎖CDR遺伝子と該マウスH鎖CDR遺伝子に対応する少なくとも1つのマウスL鎖CDR遺伝子を単離し、またヒトイムノグロブリン遺伝子から前記マウスH鎖CDRに対応するヒトH鎖CDR以外の全領域を

コードするヒトH鎖遺伝子と、前マウスL鎖CDRに対応するヒトL鎖CDR以外の全領域をコードするヒトL鎖遺伝子を単離する。

【0113】

単離した該マウスH鎖CDR遺伝子と該ヒトH鎖遺伝子を発現可能なように適當な発現ベクターに導入し、同様に該マウスL鎖CDR遺伝子と該ヒトL鎖遺伝子を発現可能なように適當なもう1つの発現ベクターに導入する。または、該マウスH鎖CDR遺伝子／ヒトH鎖遺伝子とマウスL鎖CDR遺伝子／ヒトL鎖遺伝子を同一の発現ベクターに発現可能なように導入することもできる。このようにして作製された発現ベクターで宿主細胞を形質転換することによりヒト型モノクローナル抗体産生形質転換細胞を得、該形質転換細胞を培養することにより培養上清中から目的のヒト型モノクローナル抗体を得る。

【0114】

「ヒトモノクローナル抗体」とは、イムノグロブリンを構成するH鎖の可変領域及びH鎖の定常領域並びにL鎖の可変領域及びL鎖の定常領域を含む全ての領域がヒトイムノグロブリンをコードする遺伝子に由来するイムノグロブリンである。

ヒト抗体（好ましくはヒトモノクローナル抗体）は、常法に従って、例えば、少なくともヒトイムノグロブリン遺伝子をマウス等のヒト以外の哺乳動物の遺伝子座中に組込むことにより作製されたトランスジェニック動物を、抗原で免疫感作することにより、前述したポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体の作製法と同様にして製造することができる。

【0115】

例えば、ヒト抗体を產生するトランスジェニックマウスは、Nature Genetics, Vol.7, p.13-21, 1994; Nature Genetics, Vol.15, p.146-156, 1997; 特表平4-504365号公報; 特表平7-509137号公報; 日経サイエンス、6月号、第40~第50頁、1995年; 国際出願公開W094/25585号公報; Nature, Vol.368, p.856-859, 1994; 及び特表平6-500233号公報などに記載の方法に従って作製することができる。

また、昨今開発された技術であるトランスジェニックなウシやブタのミルク中

からヒト由来タンパクを製造方法を適用することも可能である（日系サイエンス、1997年4月号、第78頁乃至84頁）。

## 【0116】

本発明における「抗体の一部」とは、前述のようなモノクローナル抗体の一部分の領域を意味し、具体的には $F(ab')_2$ 、Fab'、Fab、Fv (variable fragment of antibody)、sFv、dsFv (disulphide stabilised Fv) あるいはdAb (single domain antibody)などを意味する (Exp. Opin. Ther. Patents, 第6巻, 第5号, 第441～456頁, 1996年)。

ここで、「 $F(ab')_2$ 」及び「Fab'」とは、イムノグロブリン（モノクローナル抗体）を、蛋白分解酵素であるペプシンあるいはパパイン等で処理することにより製造され、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体フラグメントを意味する。例えば、IgGをパパインで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されて $V_L$  ( $L$ 鎖可変領域) と $C_L$  ( $L$ 鎖定常領域) からなるL鎖、及び $V_H$  ( $H$ 鎖可変領域) と $C_H \gamma 1$  ( $H$ 鎖定常領域中の $\gamma 1$ 領域) とからなるH鎖フラグメントがC末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な2つの抗体フラグメントを製造することができる。これら2つの相同的な抗体フラグメントを各々Fab' という。またIgGをペプシンで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の下流で切断されて前記2つのFab' がヒンジ領域でつながったものよりやや大きい抗体フラグメントを製造することができる。この抗体フラグメントを $F(ab')_2$  という。

## 【0117】

本発明の「医薬組成物」とは、前記で定義される「物質」、具体的には「AILIMを介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質」、さらに具体的には「AILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIM発現細胞によるサイトカインの產生を抑制する活性を有する物質」並びに薬学的に許容され得る担体とを含んでなる医薬組成物である。具体的には、前記で定義した「蛋白性物質」若しくは「非蛋白性物質」、並びに薬学的に許容され得る担体を含んでなる医薬組成物である。さらに具体的には、前記に定義したポリペプチド、該ポリペプチドの一部（断

片)、融合ポリペプチド、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体若しくは該モノクローナル抗体の一部のいずれかと薬学的に許容され得る担体を含んでなる医薬組成物である。

## 【0118】

ここで「薬学的に許容され得る担体」とは、賦形剤、希釈剤、增量剤、崩壊剤、安定剤、保存剤、緩衝剤、乳化剤、芳香剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等が挙げられる。そのような担体の一つ以上を用いることにより、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、注射剤、液剤、カプセル剤、トロー剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤あるいはシロップ剤等の形態の医薬組成物を調製することができる。

これらの医薬組成物は、経口あるいは非経口的に投与することができる。非経口投与のためのその他の形態としては、一つまたはそれ以上の活性物質を含み、常法により処方される外用液剤、腸溶内投与のための坐剤およびペッサリーなどが含まれる。

## 【0119】

投与量は、患者の年齢、性別、体重及び症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは該医薬組成物に含有される活性成分（前記ポリペプチドや抗体など）の種類などにより異なるが、通常成人一人当たり、一回につき $10\mu g$ から $1000mg$ （あるいは $10\mu g$ から $500mg$ ）の範囲で投与することができる。しかしながら、投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量より少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を越える投与量が必要な場合もある。

## 【0120】

とりわけ注射剤の場合には、例えば生理食塩水あるいは市販の注射用蒸留水等の非毒性の薬学的に許容され得る担体中に $0.1\mu g$ 抗体／ml担体～ $10mg$ 抗体／ml担体の濃度となるように溶解または懸濁することにより製造することができる。このようにして製造された注射剤は、処置を必要とするヒト患者に対し、1回の投与において $1kg$ 体重あたり、 $1\mu g$ ～ $100mg$ の割合で、好ましくは $50\mu g$ ～ $50mg$ の割合で、1日あたり1回～数回投与することができる。投与の形態としては、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射あるいは腹腔内注射のような医

療上適当な投与形態が例示できる。好ましくは静脈内注射である。

## 【0121】

また、注射剤は、場合により、非水性の希釗剤（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類など）、懸濁剤あるいは乳濁剤として調製することもできる。

## 【0122】

そのような注射剤の無菌化は、バクテリア保留フィルターを通す濾過滅菌、殺菌剤の配合または照射により行うことができる。注射剤は、用時調製の形態として製造することができる。即ち、凍結乾燥法などによって無菌の固体組成物とし、使用前に無菌の注射用蒸留水または他の溶媒に溶解して使用することができる。

## 【0123】

本発明の医薬組成物は、T細胞等のリンパ球の活性化並びに活性化リンパ球の機能制御の異常に起因する種々の自己免疫性疾患、アレルギー性疾患または炎症性疾患の治療及び予防に有用である。

## 【0124】

該疾患としては例えば、関節症（例えば、関節リウマチ、変形性関節症など）、炎症（例えば、脳炎、気管支炎、血管炎、肺炎、肝炎、心筋炎、脾炎、腸炎、胃炎、腹膜炎、腎炎（糸球体腎炎など）、関節炎（関節リウマチなど）、虚血後再灌流障害（心筋虚血再灌流障害など）における炎症、移植後免疫拒絶に起因する炎症、炎症性腸疾患、火傷、多発性臓器障害における炎症、PTCAやPTCRの術後における炎症、及び動脈硬化症に伴う炎症など）、細菌やウイルスによる感染により惹起される種々の症状（例えば、炎症）、移植片対宿主反応、移植片対宿主反応、組織や臓器の移植に伴う免疫拒絶反応、外来抗原による免疫感作により惹起される該抗原に対する抗体の過剰産生を伴う種々の疾患、多発性硬化症、自己免疫性甲状腺炎、種々の皮膚疾患（例えば、アレルギー性接触性皮膚炎、慢性炎症性皮膚疾患である扁平苔癬、乾癬、強皮症）、全身性エリテマトーデスなどが挙げられる。

## 【0125】

本発明における「炎症」には、急性炎症及び慢性炎症のいずれもが包含される。

一般に急性炎症とは、炎症反応が比較的急速に発現し進行が速く、その終了が明確な炎症である。一方、慢性炎症とは、炎症反応が比較的ゆっくりあるいは徐々に発現し、あるいはその発現の存在すた不明確な程度に発現し、数週間乃至数年間にわたり持続され、その終了も不明確な炎症である。

また、本発明における炎症には、任意の組織で起こる炎症もが包含される。具体的には、脳、眼、気管、血管、肺、肝臓、心臓、脾臓、胃、腸、腸間膜、腎臓、皮膚、鼻炎膜あるいは関節などの組織における炎症が含まれる。

本発明の医薬組成物の種々疾患症状の治療効果については、常法に従って、既知の疾患モデル動物に投与することにより試験、検討することができる。

#### 【0126】

以下、実施例を以て本発明をさらに詳細に説明するが、本発明が該実施例に記載される態様のみに限定されるものではないことは言うまでもない。

#### 【0127】

##### 実施例1 実験材料の準備

以下に述べる試験で用いた実験材料（動物、抗体、細胞）は特に断りのない限り以下のようにして調製した。

#### 【0128】

##### <1-1> 動物

C57BL/6マウス（雄、5乃至8週齢）及びBALB/cマウス（雄、5乃至8週齢）は、日本SLC（株）より購入した。Wistarラット（雄、5乃至6週齢）は、日本チャールズリバー（株）より購入した。

#### 【0129】

##### <1-2> 抗ラットAILIMモノクローナル抗体の調製

以前本発明者が作成し報告したマウス抗ラットAILIMモノクローナル抗体（マウス抗ラットJTT-1抗原モノクローナル抗体）を產生する「JTT-1」と「JTT-2」と各々命名したハイブリドーマ（2つのハイブリドーマは1996年10月11日付でブダペスト条約の下で認定された国際寄託機関である日本国通産省工業技術院生

命工学工業技術研究所に国際寄託されている。<JTT-1>国際寄託番号FERM BP-5707、及び<JTT-2>国際寄託番号FERM BP-5708) をin vitroまたはin vivoで培養して得られる培養上清または腹水から精製したモノクローナル抗体を以下の試験で用いた(日本国特許出願公開11-29599号公報(実施例1及び2)、及び国際特許出願公開W098/38216号(実施例1及び2))。

以下、これらのマウス抗ラットAILIMモノクローナル抗体を、各々「JTT-1抗体」及び「JTT-2抗体」(IgG1)と呼ぶ。なお、「JTT-1抗体」及び「JTT-2抗体」は、各々「JMab49」及び「JMab50」とも別称する。

なお、以下の試験で用いられる抗ラットAILIM抗体は特に断りのないかぎり「JTT-2抗体」(JMab50と別称; IgG1)である。

#### 【0130】

##### <1-3> 抗ヒトAILIMモノクローナル抗体の調製

以前本発明者が作成し報告したマウス抗ヒトAILIMモノクローナル抗体(マウス抗ヒトJTT-1抗原モノクローナル抗体)を産生する各々「SA12」及び「SG430」と命名したハイブリドーマ(各々 $10^6$ 乃至 $10^7$ 個/0.5ml/マウス)を、ICR nu/nuマウス(雌、7乃至8週齢)の腹腔内に注射した。10乃至20日後、マウスを麻酔下で開腹し、常法に従って採取した腹水から各々のマウス抗ヒトAILIMモノクローナル抗体を大量調製した(日本国特許出願公開11-29599号公報(実施例12)、及び国際特許出願公開W098/38216号(実施例12))。

以下、これら2種類のマウス抗ヒトAILIMモノクローナル抗体の各々を「SA12抗体」(IgG1)及び「SG430抗体」(IgG1)と呼び、以下の試験で用いた

#### 【0131】

##### <1-4> 抗マウスAILIMモノクローナル抗体の調製

以下のようにして調製した。

以前本発明者らがクローニングしたマウスAILIM(マウスJTT-1抗原)(日本国特許出願公開11-29599号公報(配列番号5)、及び国際特許出願公開W098/38216号(配列番号5))の全長アミノ酸配列をコードするcDNAを用いて、遺伝子組換え技術を用いて常法に従ってマウスAILIMを発現する形質転換細胞を調製した。

該形質転換細胞をホモジナイズし、超遠心分離( $100,000 \times g$ )して、細胞膜

画分を含む遠心残さを回収し、PBSに懸濁させた。得られた細胞膜画分を、完全フロイントアジュバントとともにWistarラットのフットパッド内に注射することにより初回免疫（0日）した。さらに該細胞膜画分抗原を7日目、14日目および28日目という間隔でフットパッド内に投与した。最後の免疫から2日後にリンパ節細胞を採取した。

## 【0132】

該リンパ節細胞とマウスミエローマ細胞PAI (JCR No.B0113; Res. Disclosure, Vol.217, p.155, 1982) とを5:1で混合し、融合剤としてポリエチレングリコール4000 (Boehringer Mannheim製) を用いて細胞融合させることによりモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマの選択は、10%ウシ胎児血清とアミノブテリンを含有するHAT含有ASF104培地（味の素製）中で培養することにより行った。

## 【0133】

各々のハイブリドーマの培養上清中に生成されたモノクローナル抗体のマウスAILIM (マウスJTT-1抗原) に対する反応性を、各々の培養上清を、前記組換えマウスAILIM発現形質転換細胞に反応させた後、FITC標識抗ラットIgG (Cappel製) と反応させることにより染色された細胞の蛍光強度をEPICS-ELITEフローサトメーターで測定することにより確認した。この結果、マウスAILIM (マウスJTT-1抗原) に反応性を有するモノクローナル抗体を産生する複数のハイブリドーマを得た。

それらのハイブリドーマの内の2つを各々「B10.5」及び「B9B6」と命名した。これらのハイブリドーマの各々（各々 $10^6$ 乃至 $10^7$ 個/0.5ml/マウス）を、ICR nu/nuマウス（雌、7乃至8週齢）の腹腔内に注射した。10乃至20日後、マウスを麻酔下で開腹し、常法に従って採取した腹水から各々のラット抗マウスAILIMモノクローナル抗体を大量調製した。以下、これらのハイブリドーマ「B10.5」及び「B9B6」の各々が産生するラット抗マウスAILIMモノクローナル抗体を「B10.5抗体」(IgG2a) 及び「B9B6抗体」(IgG2a) と呼び、以下の試験で用いた。

## 【0134】

<1-5> リンパ球の調製

マウスを断頭致死させた後、常法に従って胸腺及び末梢リンパ組織（脾臓、リンパ節）を各々採取し、ステンレス製メッシュ上で細切した。得られた細切組織を10%FCS（ウシ胎児血清）を含有するRPMI1640培地に懸濁させ細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液（各々 $1 \times 10^7$ 乃至 $3 \times 10^7/\text{ml}$ ）をシャーレに播種しCO<sub>2</sub>インキュベーター内で2時間培養した。培養後、シャーレから注意深く非粘着性細胞を回収し、RPMI1640培地で洗浄し各種組織構成細胞を取得した。

ラットの胸腺及び末梢リンパ組織（脾臓、リンパ節）の各種組織構成細胞も、前記と同様にして取得した。

ヒト（健常人及び患者）の末梢血T細胞は、常法に従い、健常人及び患者の各々から採取したヘパリン採血液をリンホプレップ（Nycomed製）で分離して末梢血単核球を取得した後、Pan T cellアイソレーションキット（ミルテニ製）を用いて回収した。

#### 【0135】

##### <1-6> 株化T細胞の調製

本発明者らが樹立した各種マウスT細胞株（D10、MS202、CD28K0、EL<sup>-</sup>、2L2、BC3C13）及びマウスT細胞由来ハイブリドーマBW5147に由来する種々マウスT細胞由来ハイブリドーマ（KV24、D0.11.10、8-4-31、3H10-11、61-21-25、1-2-66、6-13-64）を以下の試験において用いた。

#### 【0136】

##### 実施例2 各種組織構成細胞及び各種細胞株でのAILIMの発現の解析

動物（マウス、ラットまたはヒト）の正常組織及び病変組織から得られる細胞でのAILIMの発現状態の差違、未刺激T細胞及び刺激したT細胞（活性化T細胞）でのAILIMの発現状態の差違、並びに各種T細胞株でのAILIMの発現状態の差違を常法に従って細胞染色及びフローサイトメトリー（flow cytometry）によって解析した。

下記試験で得られた結果を基に、AILIMの組織及び細胞での発現パターンを、CD28の発現のパターンと比較しながら、模式的に示した（図23）。但し、当該模式図は、單なる例示であり下記試験で得られたデータを限定的に解釈するために用いられるものではないことは言うまでもない。

## 【0137】

## &lt;2-1&gt; 細胞染色及びフローサイトメトリー (flow cytometry)

細胞染色及びフローサイトメーター (flow cytometer) による解析は特に断りの無い限り下記のようにして行った。

上記のように取得した各種の組織構成細胞、刺激物質（抗CD3抗体、ConA、またはPMAとionophoreなど）で刺激若しくは未刺激のT細胞、または各種T細胞株を、0.5%ウシ血清アルブミン (BSA) 及び5mMのEDTAを含有するリン酸緩衝液 (Ca<sup>2+</sup>及びMg<sup>2+</sup>を含まない。PBS-) に再分散させた後、下記 (A) または (B) の一次抗体を加え、4℃で30分間反応させた。

(A) 前記の各種AILIM抗体（抗マウスAILIM抗体、抗ラットAILIM抗体、抗ヒトAILIM抗体）をFITCまたはPE（ピコエリスリン）で標識した標識抗体。

(B) 未標識の前記の各種AILIM抗体（抗マウスAILIM抗体、抗ラットAILIM抗体、抗ヒトAILIM抗体）。

## 【0138】

次いで、細胞を前記リン酸緩衝液で3回洗浄した後、同緩衝液に再分散させた

なお、一次抗体として未標識の抗AILIM抗体（前記 (B)）を用いた場合には、さらにFITC、PEまたはビオチン (Biotin) で標識した抗マウスIg抗体または抗ラットIg抗体を二次抗体として細胞分散液に加え、上記と同様にして反応させた。

また、二次抗体としてビオチン標識抗体を用いた場合には、PE標識したストレプトアビジン (Streptavidine；ファーミンジエン製) を細胞分散液に加え同様にして反応させた後、上記リン酸緩衝液に再分散させた。

上記染色により染色された細胞の大きさ及び蛍光強度をFACSort (Becton Dickinson製) を用いて測定し、AILIMの発現分布をLysisII解析ソフトを用いて解析した。

## 【0139】

## &lt;2-2&gt; マウス胸腺組織由来T細胞におけるAILIMの発現の解析

前記<2-1>の方法によりマウスの正常リンパ組織である胸腺から単離したT細胞におけるAILIMの発現を解析した。また同時にAILIMの発現様式の、他の分子（

T細胞への一次シグナル伝達を担うCD3分子、副刺激シグナル伝達を担うCD28分子、T細胞表面マーカーであるCD4及びCD8) の発現との相関性についても同様にして解析した。

結果を、図1及び図2に示す。この結果下記新たな知見が得られた。

#### 【0140】

まず、CD3分子とAILIM分子との発現の相関性については、AILIMの発現はCD3の発現が高い細胞で同様に高い発現が認められ、両分子の発現が相関していた(図1(a))。一方、前者とは対照的に、コスティミュレイトリー分子であるCD28の発現はCD3の発現が高い程その発現が低下していた(図1(b))。これらの結果から、少なくとも正常胸腺T細胞においては、AILIM及びCD28の発現様式は、CD3の発現との相関性の点で比較した場合、互いに相反するものであった。

#### 【0141】

胸腺T細胞の分化及び成熟の段階は、概ね次のとおりのステップを経る。

- (1) CD4陰性CD8陰性細胞(図2のR2)から両分子の発現が僅かに認められるCD4弱陽性CD8弱陽性細胞(図2のR3)へ移行。
- (2) CD4弱陽性CD8弱陽性細胞(図2のR3)から両分子を完全に発現するCD4陽性CD8陽性細胞(図2のR4)へと分化。
- (3) ポジティブセレクションによりCD4またはCD8いずれか一方の分子の発現が減弱してゆき(図2のR5またはR7)、最終的なCD4陽性CD8陰性(図2のR6)またはCD4陰性CD8陽性(図2のR8)への分化、及び成熟の完了。

#### 【0142】

CD4陰性CD8陰性細胞においては、AILIM及びCD28とともに発現が見られず、CD4弱陽性CD8弱陽性細胞になりともに僅かな発現が見られた。CD28の発現は、CD4陽性CD8陽性細胞で最大となり、その後の分化。成熟に伴って発現が低下した。

一方、AILIMの発現は、CD4陽性CD8陽性細胞においても僅かしか認めらないものの、その後の細胞の分化、即ち、CD4またはCD8の発現量の低下に伴い増加し、リンパ球のポジティブセレクションが達成されるSP細胞(CD4陽性CD8陰性細胞またはCD4陰性CD8陽性細胞)へ最終分化した時点で最大の発現が認められた。

この結果、AILIMの発現様式は、CD3だけでなくCD4及びCD8の発現との相関性の

点においても、CD28と異なるものであることが明らかとなった。

#### 【0143】

##### 〈2-3〉 マウス正常リンパ組織由来T細胞におけるAILIMの発現の解析

前記方法により、マウスの正常リンパ組織である脾臓及びリンパ節各々のT細胞におけるAILIMの発現を解析した。

結果を図3に示す。

脾臓組織由来T細胞におけるAILIM陽性T細胞は、胸腺でのそれと比べ少数であり、その比率は約1乃至3%であった。また、AILIM陽性細胞のほとんどは、CD4陽性CD8陰性細胞であった。

リンパ節由来T細胞におけるAILIMの発現は、発現様式及び発現細胞の比率とともに、前記脾臓由来T細胞でのそれと同様であった。

#### 【0144】

##### 〈2-4〉 マウス肝炎モデル動物の病変組織由来T細胞でのAILIMの発現の解析

肝炎モデルマウスを下記のように作製した。

C57BL/6マウスにP.acnes (*Propionibacterium acnes*; 5mg/ml) を含むのリン酸緩衝液 (PBS-; 0.2ml) 溶液を尾静注した。1週間後、該マウスにLPS (*Lipopolysaccharide*; 1.5 μg/ml) を含むリン酸緩衝液 (PBS-; 0.2ml) を静注することにより肝炎を誘導した。このマウスを肝炎モデル動物として用いた。

LPS投与から6.5時間後、肝臓を採取し、前記方法によりT細胞を取得し、AILIMの発現を解析した。

結果を図4に示す。

当該肝炎モデルマウスの肝臓組織由来T細胞（単核細胞）におけるAILIMの発現は極めて高いものであり、T細胞のほとんどにおいて顕著な発現が認められた。肝炎モデル肝臓由来T細胞でのAILIMの発現の程度は、正常マウス脾臓由来T細胞（CD4陽性細胞）及びリンパ節由来T細胞でのそれに比べ著しく高いものであった。

---

#### 【0145】

##### 〈2-5〉 健常人の末梢血由来T細胞におけるAILIMの発現の解析

健常人末梢血由来T細胞におけるAILIMの発現、並びに健常人末梢血から分離し

たヒト単核球細胞でのAILIMの発現のレベル及び各種細胞表面マーカーの発現をフローサイトメーターにより解析した。健常人の末梢血T細胞は、前記方法により取得した。

一方、AILIMを発現しているT細胞（AILIM陽性細胞）は、次のとおり取得した。健常人末梢血より分離した単核球の分画を、0.5%BSA及び5mMのEDTAを含むPBSで分散した後、抗AILIM抗体（SG430；50μg）を加え4°Cで30分間反応させた。次いで、同緩衝液で3回洗浄後、ヤギ抗マウスIgGを固定化したマイクロビーズ（100乃至500μl；ミルテニ製）を加えて同様の反応を行い、同緩衝液で洗浄した。次いで、細胞を、常法に従い磁気分離カラム操作（2回）に供し、AILIM陽性細胞を回収した。回収したAILIM陽性細胞を、各種標識抗体または抗AILIM抗体により染色し、フローサイトメーターにより解析した。

結果を、図24に示す。

#### 【0146】

末梢血T細胞は、主としてCD4陽性CD8陰性細胞とCD4陰性CD8陽性細胞に分けられる。FITC標識抗AILIM抗体（SA12）と抗CD4抗体との共染色では、主にCD4陽性細胞でAILIMの発現が認められた。抗CD28抗体との二重染色により、末梢血AILIM陽性細胞のほぼ全てがCD28を発現していることが分かった。また、末梢血T細胞におけるAILIM陽性細胞の比率は、概ね0.5乃至5%程度であった。

一方、ヒト末梢血単核球分画から直接分離したAILIM陽性細胞における表面マーカーの解析の結果から、下記が判明した。

- (1) AILIM陽性細胞の多くが、CD4陽性CD8陰性細胞であった。
- (2) AILIM陽性細胞の中には、僅かにCD4陰性CD8陽性細胞、及びCD4陰性CD8陰性細胞が認められた。
- (3) 抗CD28抗体との共染色により、AILIM陽性細胞のほとんどがCD28を発現しており、AILIM陽性細胞のほとんどがT細胞に分類された。
- (4) AILIM陽性細胞の中には、B細胞表面マーカーであるCD19に対する抗体で染色される細胞が認められることから、B細胞にも僅かにAILIMが発現していることが示された。
- (5) AILIM陽性細胞の多くにおいて、コスティミュレイトイー分子であるCTLA4

の発現が認められた。

さらに、末梢血T細胞及びAILIM陽性細胞の各々でのAILIMの発現レベルについても合わせて検討した。

結果を図25に示す。

#### 【0147】

AILIM陽性細胞でのAILIMの発現を、末梢血T細胞でのそれと比べるとピークシフトが認められることから、AILIM陽性細胞ではAILIMに発現レベルが高いことが確認された。

また、同様の比較をCD4陽性細胞及びCD8陽性細胞の各々について行った結果、いずれの分画においても、同程度のAILIMの発現が認められた。CD8陽性細胞は、AILIM陽性細胞の中での比率は少ないものの、同様のAILIMの発現が認められた。

#### 【0148】

〈2-6〉 各種関節炎または自己免疫疾患に罹患している患者のT細胞におけるAILIMの発現の解析

前記方法と同様にして、関節炎（慢性関節リウマチ（rheumatoid arthritis; RA）及び変形性関節炎（osteoarthritis; OA）、並びに自己免疫疾患（進行性全身性硬化症（progressive systemic sclerosis; PSS）及び全身性エリテマトーデス（systemic lupus erythematosus; SLE）に罹患している患者のT細胞におけるAILIMの発現及びAILIMを発現している細胞の比率を分析した。

関節炎患者については、関節腔液及び末梢血の各々から分離したT細胞を使用した。一方、自己免疫疾患患者からは末梢血から分離したT細胞を用いた。また、対照として、健常人の末梢血のT細胞を用いた。

結果を図5及び図26に示した。

#### 【0149】

RA患者の末梢血由来T細胞におけるAILIMの発現は、CD4陽性T細胞及びCD4陰性T細胞（即ちCD4陰性CD8陽性T細胞）のいずれにおいても、健常人の末梢血由来T細胞におけるAILIMの発現と比べ有意な差は認められなかった。

しかしながら、RA患者の関節腔液由来T細胞においては、CD4陽性T細胞及びCD4陰性T細胞のいずれにおいてもAILIMの発現している細胞の比率が有意に上昇して

いた。特に、CD4陽性T細胞集団においては、AILIMの発現の平均値が約20%にまで上昇していた。また、RA患者の関節腔液由来のCD4陽性T細胞及びCD4陰性T細胞の各々におけるAILIMの発現レベルは、健常人の末梢血の由来のCD4陽性T細胞及びCD4陰性T細胞の各々と比べ有意な上昇が認められた。RA患者のCD4陽性T細胞においては、CD28の発現レベルの変化は認められなかった。

一方、OA患者については、1例ではあるが、関節腔液由来CD4陽性細胞においてAILIM陽性細胞の比率が著しく上昇していた。

自己免疫疾患患者の末梢血由来T細胞については、CD4陰性T細胞におけるAILIM陽性細胞の比率は健常人のそれに比べ差が認められないものの、PSS患者由来CD4陽性T細胞においては健常人に比べAILIM陽性細胞の比率が有意に上昇していた。

#### 【0150】

##### <2-7> アジュバント誘発性関節炎ラットモデルにおけるAILIMの発現の解析

流動パラフィン（和光純薬製）にて10mg/mlの濃度に調製した結核死菌（M.Tuberculosis H37Ra; Difco）をアジュバントとして、1mg/0.1ml/匹の濃度でWistarラット（雄、5週齢、チャールズリバー製）の尾根部に皮内投与して関節炎を誘発させた。プレシズモーメーターを用いて両後肢足容積を計測し当該容積を指標として関節炎の発症を確認した。

アジュバントの投与日（0日）から経時的に胸腺、脾臓、リンパ節及び末梢血を採取し、前記方法に従ってT細胞分散液を調製した。T細胞を、前記方法により抗CD4抗体、抗CD8抗体及び抗AILIM抗体の各々で染色し、CD4、CD8及びAILIMの各々の発現をフローサイトメーターを用いて解析した。

なお、対照

結果を図27に示す。

#### 【0151】

胸腺、脾臓及び末梢血の各々に由来するT細胞については、CD4陽性T細胞及びCD8陽性T細胞のいずれにおいても、対象と比べAILIMの発現の有意な差違を認められなかった。

一方、リンパ節由来T細胞については、CD4陽性T細胞及びCD8陽性T細胞のいずれにおいても、対象と比べAILIM陽性細胞の比率が有意に上昇していた。とりわけ

け、CD4陽性T細胞においては、アジュバント投与から5日目には、AILIMの発現のピークが認められた。

## 【0152】

## &lt;2-8&gt; マウスT細胞の活性化に伴うAILIMの発現の変化の解析

マウスのリンパ組織から採取したT細胞を各種条件下で活性化し、T細胞の活性化に伴うAILIMの発現の変化を解析した。

T細胞の活性化は、10%FCS含有RPMI1640培地に分散したT細胞に、抗CD3抗体（最終濃度：1乃至 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ）、コンカナバリンA（Concanavalin A; ConA；最終濃度：1乃至 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ ）、またはPMA（phorbol myristate acetate；最終濃度： $20\text{ng}/\text{ml}$ ）とCa Ionophore（最終濃度： $200\text{ng}/\text{ml}$ ）を加えて刺激することにより行った。該活性化剤の添加から経時的（0、6、12、24、及び48時間）にAILIMの発現を解析した。

結果を図6に示す。

いずれの活性化の条件においても、刺激後約3乃至6時間後にAILIMの発現の上昇が認められ、刺激から12時間の時点で最大のAILIMの発現が認められた。AILIMの発現は、刺激から約24時間以降においてもAILIMの高い発現が認められ、刺激後48時間の時点でも同程度の発現レベルが持続されていた。

## 【0153】

## &lt;2-9&gt; ヒトT細胞の活性化に伴うAILIMの発現誘導の解析

前記と同様にして取得した健常人の末梢血由来T細胞を、下記(A)及び(B)の方法により活性化することによりT細胞の活性化に伴うAILIM及びコスティミュレイトリーモノクローナル抗体であるCTLA-4の各々の発現を解析した。

## (A) PMAとCa IonophoreによるT細胞の活性化

10%FCS含有RPMI1640培地に分散した該ヒトT細胞（ $1 \times 10^5$ 個）に、活性化剤としてPMA（最終濃度： $20\text{ng}/\text{ml}$ ）及びCa Ionophore（最終濃度： $200\text{ng}/\text{ml}$ ）を加えて刺激した。活性化剤添加から8時間後に、AILIM及びCTLA-4の各々の発現をフローサイトメーターにより解析した。

## (B) 抗CD3抗体/抗AILIM抗体または抗CD3抗体/抗CD28抗体による活性化

96ウェルマイクロプレートの各ウェルに、D-PBSで希釈した(1)抗CD3抗体(

クローンOKT3; 200ng/ウェル) 及び抗AILIM抗体(クローンSA12; 1μg/ウェル) または(2) 抗CD3抗体(クローンOKT3; 200ng/ウェル) 及び抗CD28抗体(クローンCD28.2; 1μg/ウェル) を加え、室温で3時間反応させることにより、該プレートを各々の抗体でコーティングした。

各プレートに、10%FCS含有RPMI1640培地に分散したヒト末梢血由来T細胞( $1 \times 10^5$ 個/ml、0.1ml/ウェル)を加え、2乃至3日間培養した。細胞を回収し、前記と同様にしてAILIM及びCTLA-4の発現をフローサイトメーターを用いて解析した。

結果を図28に示す。

#### 【0154】

PMAとIonophoreによるT細胞の活性化においては、刺激後8時間後に著しく高いAILIMの発現が誘導された。また、その発現レベルは、同様に誘導されるCTLA-4の発現レベルに比べ極めて高いものであった。さらに、ほとんど全てのT細胞においてAILIMの発現が誘導された。さらに、CD4とAILIM、またはCD8とAILIMの二重染色試験の結果から、この活性化により、CD4陽性T細胞及びCD8陽性T細胞のいずれにおいてもAILIMの有意な発現が誘導されることが分かった。

一方、マイクロプレートにコーティングした抗CD3抗体/抗AILIM抗体、または抗CD3抗体/抗CD28抗体による活性化の試験においては、下記の結果が得られた。

(1) 抗CD3抗体/抗AILIM抗体により活性化されたT細胞、及び抗CD3抗体/抗CD28抗体により活性化されたT細胞のいずれにおいても顕著なAILIMの発現誘導が認められた。その発現誘導の程度は、抗CD3抗体/抗AILIM抗体により活性化されたT細胞での発現誘導の程度よりも、抗CD3抗体/抗CD28抗体により活性化されたT細胞における発現の程度の方が高いものであった。

(2) 抗CD3抗体/抗AILIM抗体により活性化されたT細胞、及び抗CD3抗体/抗CD28抗体により活性化されたT細胞のいずれにおいてもCTLA-4の発現誘導が認められた。しかしながら、抗CD3抗体/抗AILIM抗体により活性化されたT細胞での発現誘導の程度と、抗CD3抗体/抗CD28抗体により活性化されたT細胞における発現の程度とに有意な差は認められなかった。

#### 【0155】

## &lt;2-10&gt; 各種T細胞株でのAILIMの発現の解析

T細胞株は、主に自然発的に不死化されるか、または科学的に処理して不死化されたT細胞株、またはT細胞をミエローマ細胞と細胞融合して不死化されたT細胞ハイブリドーマが知られている。また、T細胞株は、該細胞のサイトカイン産生の特性に従いTh1型T細胞株及びTh2型T細胞株に分類される。

前記<1-6>に記載した各種の既知のマウスT細胞株におけるAILIM及びCD28の発現を前記と同様にしてフローサイトメーターを用いて解析した。

結果を図7に示す。

AILIMは、Th2型T細胞株のサイトカイン産生の性状を有する株化T細胞(D10, MS202, CD28K0, EL-4など)で構成的な(consitutive)な発現が認められた。また、それらの細胞株でのAILIMの発現は、CD28の発現と同等またはそれ以上に高い発現であった。

一方、Th1型T細胞株では、6-13-64を除いてCD28の発現は高いものの、AILIMの発現は認められなかった。

## 【0156】

## 実施例3 抗AILIM抗体によるT細胞反応の制御能の有無の検討

本発明の一部を構成する抗AILIM抗体が、T細胞反応(IFN- $\gamma$ やIL-4などのサイトカインの産生、及び細胞増殖など)を制御(促進及び/または抑制)する能力を有するか否か、即ちAILIMを介したコスティミュレイトリーシグナル(co-stimulatory signal)の細胞内への伝達の制御能を有するか否かを、該細胞からのサイトカイン(IFN- $\gamma$ 及びIL-4)の産生量、並びに該細胞の増殖の程度を指標に解析した。

## 【0157】

## &lt;3-1&gt; 試験方法

試験の目的に応じて、前述で準備した1または2種類の抗体(抗CD3抗体のみ、抗CD28抗体のみ、抗CD3抗体と抗AILIM抗体、または抗CD3抗体と抗CD28抗体)を96穴マイクロプレートに加え、37°Cで1時間以上反応させて、該プレートを1または2の該抗体でコーティングした。プレートをPBSで十分に洗浄した後、前記で調製した胸腺細胞( $5 \times 10^5$ 個/well)、脾臓細胞( $2 \times 10^5$ 個/well)または精

製T細胞 ( $1 \times 10^5$  乃至  $3 \times 10^5$  個/well) を播種した。

抗AILIM抗体または抗CD28抗体プレートへのコーティングする代わりに、いずれかを後に添加する試験においては、該抗AILIM抗体または抗CD28抗体は、プレートへの細胞の播種の後に添加した。また、この試験においては、対照として抗AILIM抗体の代わりに、CTLA4-Ig (CTLA4の可溶性領域とIgFcとの融合蛋白) を用いて同様にして試験した。

プレートをCO<sub>2</sub>インキュベーター中で2乃至4日間培養し、培養上清中のサイトカイン (IFN-γ またはIL-4) の濃度を常法に従ってELISAで測定した。また、培養後の細胞増殖の程度を、常法に従ってトリチウム標識チミジン (<sup>3</sup>H-TdR) 取込試験により評価した。

#### 【0158】

<3-2> 抗CD3抗体と抗AILIM抗体でのT細胞内へのコスティミュレイトリーシグナルの伝達によるサイトカイン産生の誘導の解析

T細胞は、T細胞受容体を介する一次シグナル、及びCD28やCTLA-4などのコスティミュレイトリー分子を介する副シグナルを受けることによって特徴的なサイトカインを産生することが知られている。

前記<3-1>の試験方法に従って、マウス、ラット及びヒトの各々から取得した末梢血T細胞、胸腺細胞または脾臓細胞を用いて、種々の抗体刺激による種々サイトカイン産生の誘導を解析した。

#### 【0159】

<3-2-1> マウス脾臓由来T細胞からのIFN γ の誘導

(1) 抗CD3抗体 (クローン145-2C11; Pharmingen製; 0乃至 $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 及び抗CD28抗体 (クローンCD28.2;  $1 \mu\text{g}/\text{well}$ ) をコーティングしたマイクロプレート、(2) 抗CD3抗体及び抗マウスAILIM抗体 (クローンB10.5;  $1 \mu\text{g}/\text{well}$ ) でコーティングしたマイクロプレート、及び(3) 抗CD3抗体のみでコーティングしたマイクロプレートの各々に、マウス脾臓由来T細胞を加え培養し、培養上清中のIFN γ の量をELISAにより測定した。

結果を図8に示す。

抗CD3抗体のみの刺激ではIFN γ の産生は誘導されないものの、抗CD3抗体/抗AI

LIM抗体による刺激、及び抗CD3抗体/抗CD28抗体による刺激のいずれにおいてもIFN $\gamma$ の有意な産生誘導が認められた。また、その産生誘導は、抗CD3抗体の濃度に依存して増大した。

## 【0160】

<3-2-2> ラット脾臓由来T細胞からのIFN $\gamma$ の産生誘導

(1)抗CD3抗体（クローンG4.18；50ng/well）及び抗CD28抗体（クローンJJ316；1 $\mu$ g/well）をコーティングしたマイクロプレート、(2)抗CD3抗体及び抗ラットAILIM抗体（クローンJTT1；1 $\mu$ g/well）でコーティングしたマイクロプレート、及び(3)抗CD3抗体のみでコーティングしたマイクロプレート、(4)抗AILIM抗体のみでコーティングしたマイクロプレートの各々に、ラット脾臓由来T細胞を加え培養し、培養上清中のIFN $\gamma$ の量をELISAにより測定した。

結果を図9に示す。

抗CD3抗体のみ、抗AILIM抗体のみ、及び抗CD28抗体のみの刺激では、いずれの場合もIFN $\gamma$ の有意な産生は認められないものの、抗CD3抗体/抗AILIM抗体による刺激、及び抗CD3抗体/抗CD28抗体による刺激のいずれにおいてもIFN $\gamma$ の有意な産生誘導が認められた。また、その産生誘導は、経時的に増大した。

## 【0161】

<3-2-3> ヒト末梢血由来T細胞からのIFN $\gamma$ の産生誘導

(1)抗CD3抗体（クローンOKT3；一定濃度）及び抗AILIM抗体（クローンSA12；各種濃度）をコーティングしたマイクロプレート、及び(2)抗CD3抗体のみでコーティングしたマイクロプレートの各々に、ヒト末梢血由来T細胞を加え培養し、培養上清中のIFN $\gamma$ の量をELISAにより測定した。なお、(2)の試験においては、抗AILIM抗体を溶液として細胞添加の後に加えた。

結果を図10に示す。

## 【0162】

一定濃度の抗CD3抗体のみをコーティングしたマイクロプレートにT細胞を加え、抗AILIM抗体を溶液として細胞添加の後に加えた試験においては、抗AILIM抗体の濃度を20 $\mu$ g/mlまで増加させても細胞からのIFN $\gamma$ の産生誘導は認められなか

った。

一方、抗CD3抗体と抗AILIM抗体をともにコーティングしたマイクロプレートで培養したヒトT細胞からは、抗AILIM抗体の濃度が $5\mu\text{g/ml}$ 以上の場合に、顕著なIFN $\gamma$ の産生誘導が認められた。

また、ConAまたはPMAで刺激した末梢血由来T細胞を、前記と同様にして抗AILIM抗体及び抗CD3抗体の両方をコーティングしたプレート中で培養すると、当該T細胞からのサイトカインの産生及び細胞増殖が促進された。また、この結果は、ConAまたはPMAで刺激した末梢血由来T細胞を、抗CD28抗体及び抗CD3抗体の両方をコーティングしたプレート中で培養した場合の結果と同等であった。

#### 【0163】

<3-2-4> ヒト末梢血由来T細胞からのTNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$ 、IL-2、IL-4及びIL-10の産生誘導

(1) 抗CD3抗体（クローンOKT3；200ng/well）のみをコーティングしたマイクロプレート、(2) 抗CD28抗体（クローンCD28.2；1 $\mu\text{g}/\text{well}$ ）のみをコーティングしたマイクロプレート、(3) 抗ヒトAILIM抗体（クローンSA12；1 $\mu\text{g}/\text{well}$ ）でコーティングしたマイクロプレート、(4) 抗CD3抗体及び抗CD28抗体でコーティングしたマイクロプレート、(5) 抗CD3抗体及び抗AILIM抗体でコーティングしたマイクロプレート、及び(6) 抗CD3抗体、抗AILIM抗体及び抗CD28抗体でコーティングしたマイクロプレートの各々に、異なる2名の健常人ドナーの末梢血から所得したT細胞の各々を加え培養し、経時的（18、40及び64時間）に培養上清中のTNF $\alpha$ （tumor necrosis factor- $\alpha$ ）、IFN $\gamma$ （interferon- $\gamma$ ）、IL-2（interleukin-2）、IL-4（interleukin-4）及びIL-10（interleukin-10）の各々の量をELISAにより測定した。

なお、TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$ 及びIL-2は、Th1型T細胞が産生するサイトカインであり、IL-4及びIL-10はTh2型T細胞が産生するサイトカインである。

結果を図29に示す。下記の結果が得られた。

#### 【0164】

(1) TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$ 及びIL-2の産生誘導については、ドナー間での差違は認められなかった。

(2) TNF $\alpha$ 及びIFN $\gamma$ については、抗CD3抗体単独による刺激でも両者の産生誘導が認められた。

(3) 抗CD3抗体単独による刺激によるTNF $\alpha$ 及びIFN $\gamma$ の各々の産生誘導の程度に比べ、抗CD3抗体及び抗CD28抗体による刺激、及び抗CD3抗体及び抗AILIM抗体による刺激のいずれの刺激によっても、TNF $\alpha$ 及びIFN $\gamma$ の各々の産生誘導が相加的に上昇した。

(4) IL-2については、抗CD3抗体及び抗CD28抗体による刺激、抗CD3抗体及び抗AILIM抗体による刺激、並びに抗CD3抗体、抗CD28抗体及び抗AILIM抗体による刺激によりその産生が誘導された。また、抗CD3抗体、抗CD28抗体及び抗AILIM抗体による刺激により最も高いIL-2の産生誘導が認められた。

(5) Th2サイトカインであるIL-4及びIL-10については、それらの産生誘導にドナー間の差違が認められた。これは、ヒト個体間での構成T細胞の差違を反映している可能性が推察された。

#### 【0165】

(6) IL-4については、抗CD3抗体及び抗CD28抗体による刺激、抗CD3抗体及び抗AILIM抗体による刺激、並びに抗CD3抗体、抗CD28抗体及び抗AILIM抗体による刺激によりその産生が誘導された。また、抗CD3抗体、抗CD28抗体及び抗AILIM抗体による刺激により最も高いIL-4の産生誘導が認められた。

(7) IL-10については、抗CD3抗体及び抗CD28抗体による刺激、抗CD3抗体及び抗AILIM抗体による刺激、並びに抗CD3抗体、抗CD28抗体及び抗AILIM抗体による刺激によりその産生が誘導された。また、抗CD28抗体及び抗AILIM抗体による刺激により、IL-10の顕著な産生誘導が認められた。さらに、抗CD3抗体、抗CD28抗体及び抗AILIM抗体の3抗体による刺激により最も高いIL-10の産生誘導が認められた。

前記試験の結果は、プレートにコーティングした抗CD3抗体が抗原提示細胞上のMHCとして働き、同コーティングした抗AILIM抗体がAILIMのリガンドとして働き、結果として、加えたT細胞の細胞内に、T細胞の活性化に必要な第1のシグナルと副刺激シグナル（コスティミュレイトリーシグナル）が伝達されたことを示している。

## 【0166】

〈3-3〉 CD3を介したシグナルにより誘導されたT細胞反応としてのサイトカイン産生誘導の抗AILIM抗体による抑制

T細胞を、抗CD3抗体をコーティングしたマイクロプレート中で培養することにより誘導されるT細胞反応としてのIFN $\gamma$ 及びIL-4の産生誘導を、抗AILIM抗体及び抗CD28抗体の各々が抑制するか否かを検討した。

抗CD3抗体のみをコーティングしたマイクロプレートに、末梢血由来T細胞、胸腺由来T細胞または脾臓由来T細胞を蒔き、次いで抗AILIM抗体（各種濃度）、抗CD28抗体（各種濃度）またはCTLA4-IgFc（対照）のいずれかを加え、培養上清中のIFN $\gamma$ またはIL-4の量を前記〈3-1〉の方法に従って解析した。

結果を図11、図12、図13及び図14に示す。

## 【0167】

抗CD3抗体による刺激により誘導される末梢血由来T細胞からのIFN $\gamma$ 及びIL-4の産生のいずれもが、抗AILIM抗体の添加により有意に抑制された（図11及び図12）。また、抗AILIM抗体の添加により細胞増殖も抑制された。一方、抗CD28抗体の添加では、サイトカイン産生の抑制及び細胞増殖の抑制のいずれも認められなかった。

抗CD3抗体による刺激により誘導される胸腺由来T細胞からのIL-4の産生は、抗AILIM抗体の添加により著しく阻害された（図13）。また、抗AILIM抗体の添加により細胞増殖も抑制された。一方、対照としてのCTLA4-IgFcの添加によっては、IL-4産生の有意な抑制並びに細胞増殖の抑制は認められなかった。

抗CD3抗体による刺激により誘導される脾臓由来T細胞からのIL-4の産生は、抗AILIM抗体の添加により著しく阻害された（図14）。また、抗AILIM抗体の添加により細胞増殖も抑制された。一方、対照としてのCTLA4-IgFcの添加によっては、IL-4産生の有意な抑制及び細胞増殖の抑制は認められなかった。

## 【0168】

〈3-4〉 抗CD3抗体と抗AILIM抗体でのT細胞内へのコスティミュレイトリーシグナルの伝達によるT細胞の細胞増殖の誘導の解析

T細胞は、T細胞受容体を介する一次シグナル、及びCD28やCTLA-4などのコステ

イミュレイトリー分子を介する副シグナルを受けることによって増殖する。

前記<3-1>の試験方法に従って、健常人の末梢血由来T細胞、マウス脾臓細胞、マウス脾臓由来T細胞、及びラットリンパ節T細胞の各々を用いて、種々の抗体刺激による細胞の増殖の誘導を解析した。

### 【0169】

#### <3-4-1> ヒト末梢血由来T細胞の増殖の誘導

(1) 抗CD3抗体（クローンOKT3；200ng/well；Ortho Diagnostic Systems製）のみをコーティングしたマイクロプレート、(2)抗CD3抗体及び抗CD28抗体（クローンCD28.2；種々濃度；Pharmingen製）をコーティングしたマイクロプレート、(3)抗CD3抗体（200ng/well）及び抗AILIM抗体（クローンSA12；各種濃度）をコーティングしたマイクロプレート、及び(4)抗CD3抗体（200ng/well）、抗ヒトAILIM抗体（種々濃度）及び抗CD28抗体（1 μg/well）でコーティングしたマイクロプレートの各々に、ヒト末梢血由来T細胞を加え培養し、細胞増殖の程度を、常法に従ってトリチウム標識チミジン（<sup>3</sup>H-TdR）取込試験により経時的に評価した。

結果を図30に示す。本試験により下記の結果が得られた。

(i) ヒト末梢血由来T細胞は、前記(2)乃至(4)のいずれの刺激によっても有意に増殖した。また、該増殖は、プレートにコーティングした抗AILIM抗体または抗CD28抗体の濃度に依存するものであった。

(ii) T細胞の最大増殖誘導活性は、前記(2)乃至(4)のいずれの抗体コーティングプレートによる刺激であってもほぼ同程度であった。

### 【0170】

次いで、前記各種抗体の刺激によるヒト末梢血由来T細胞の経時的な増殖誘導活性を検討するため、下記(5)、(6)及び(7)のマイクロプレートを用いて前記と同様にしてT細胞の増殖の程度を測定した。

(5) 抗CD3抗体（200ng/well）及び抗CD28抗体（1 μg/well）をコーティングしたマイクロプレート、(6)抗CD3抗体（200ng/well）及び抗AILIM抗体（1 μg/well）をコーティングしたマイクロプレート、及び(7)抗CD3抗体（200ng/well）、抗ヒトAILIM抗体（1 μg/well）及び抗CD28抗体（1 μg/well）でコーティングしたマイクロプレート。

結果を図31に示す。

【0171】

T細胞の増殖は、いずれの組み合わせの抗体による刺激においても刺激後18時間目以降で認められた。抗体による刺激後40時間においては、抗CD3抗体と抗体CD28抗体との組み合わせによる刺激（前記(5)）において最も強いT細胞の増殖誘導が認められたものの、当該組み合わせによるT細胞増殖誘導活性は既に平衡に達していた。

一方、抗CD3抗体と抗AILIM抗体による刺激（前記(6)）及び3種類の抗体による刺激（前記(7)）でのT細胞の増殖誘導活性は、刺激後60時間目にピークが認められた。また、これら2つの組み合わせによる刺激による刺激後60時間目のT細胞増殖誘導活性は、抗CD3抗体と抗CD28抗体の組み合わせによるそれよりも有意に高いものであった。

【0172】

<3-4-2> マウス脾臓細胞及びマウス脾臓由来T細胞の増殖誘導

<3-4-2-1> 抗体固定化マイクロプレートでの細胞増殖誘導

96穴マイクロプレートを抗CD3抗体（クローン145-2C11；Pharmingen製；50ng/well）でコーティングした。次いで、該プレートを各種濃度の抗マウスAILIM抗体（クローンB10.5）または対照抗体である抗NP-KLH抗体でコーティングした。各々の抗体に、マウス脾臓細胞及びマウス脾臓由来T細胞の各々を加え培養し、常法に従ってトリチウム標識チミジン（<sup>3</sup>H-TdR）取込試験により細胞増殖の程度を測定した。

なお、対照抗体である抗NP-KLH抗体の調製のための抗原としては、KLH（keyhole limpet hemocyanin、ピアース（PIERCE）社製）にハプテンであるNP（Nitrophe nol）を結合させたNP-KLHを用いた。

結果を図32に示す。

マウス脾臓細胞及びマウス脾臓由来T細胞のいずれも、対照抗体である抗NP-KLH抗体の刺激によっては増殖が認められなかった。一方、いずれの細胞においても、抗AILIM抗体の刺激により抗AILIM抗体の濃度依存的に有意な増殖が認められた。

## 【0173】

## &lt;3-4-2-2&gt; 抗体固定化マイクロビーズでの細胞増殖誘導（その1）

抗体を固定化する担体としてマイクロプレートの代わりにラッテクスマイクロビーズを用いて前記と同様な細胞増殖試験を行った。

D-PBS中で、 $1 \times 10^7$ 個のビーズあたり、(1)  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗CD3抗体（クローン145-2C11；Pharmingen製）と各種濃度の抗AILIM抗体（クローンB10.5）、または(2)  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗CD3抗体と各種濃度の抗NP-KLH抗体を加えて1時間以上反応させ、D-PBSで洗浄して抗体をビーズに固定化した。

96穴マイクロプレートを用いて、10%FCS含有RPMI1640培地中に分散させたC57BL/6マウスの脾臓細胞（ $1 \times 10^5/\text{well}$ ）に、該ビーズ（ $1 \times 10^5$ 個/well）を加え56時間反応させた。反応後の細胞増殖の程度を、常法に従ってトリチウム標識チミジン（ $^3\text{H-TdR}$ ）取込試験により細胞増殖の程度を測定した。

結果を図33に示す。

C57BL/6マウス脾臓細胞は、抗CD3抗体と抗AILIM抗体による刺激、及び抗CD3抗体と抗CD28抗体による刺激のいずれによっても増殖が誘導された。また、細胞増殖の程度は、ビーズに固定化した抗AILIM抗体または抗CD28抗体の濃度の増大（抗CD3抗体の濃度に対する抗AILIM抗体または抗CD28抗体の濃度の比率の増大）に依存して上昇した。また、細胞増殖の程度は、抗CD3抗体の濃度と抗AILIM抗体の濃度の比率、及び抗CD3抗体の濃度と抗CD28抗体の濃度の比率がともに1:9において最大であった。

## 【0174】

## &lt;3-4-2-3&gt; 抗体固定化マイクロビーズでの細胞増殖誘導（その2）

前記<3-4-2-2>の結果に基づき、抗CD3抗体の濃度と抗AILIM抗体の濃度の比率、及び抗CD3抗体の濃度と抗CD28抗体の濃度の比率がともに1:9の条件で抗体コーティングしたラテックスピーズを用いて、前記と同様にマウス細胞の細胞増殖を解析した。

なお、本試験においては、マウス脾臓細胞の分散液（ $1 \times 10^5/\text{well}$ ）に加える抗体コーティングマイクロビーズの濃度を各種濃度に設定した。

また、本試験においては、マウス細胞として、BALB/Cマウスの脾臓細胞及びBA

LB/Cマウスの脾臓由来T細胞の各々を用いた。

また、対照として、抗CD3抗体のみを固定化したマイクロビーズを用いて同様にして試験を行った。

結果を図34及び図35に示す。

#### 【0175】

BALB/Cマウス脾臓細胞及びBALB/Cマウス脾臓由来T細胞のいずれも、(1)抗CD3抗体単独による刺激、(2)抗CD3抗体と抗AILIM抗体による刺激、及び(3)抗CD3抗体と抗CD28抗体による刺激のいずれによっても増殖が誘導された。

また、その細胞増殖は、細胞に加えたマイクロビーズの濃度（即ち、抗体の濃度）の増大に依存して上昇した。

BALB/Cマウス脾臓細胞及びBALB/Cマウス脾臓由来T細胞のいずれにおいても、細胞に加えたマイクロビーズの濃度が30,000個/wellの時に最大の細胞増殖が誘導された。この結果は、抗CD3抗体と抗AILIM抗体をコーティングしたビーズを用いた場合も、抗CD3抗体と抗CD28抗体をコーティングしたマイクロビーズを用いた場合も同様であった。

#### 【0176】

##### <3-4-3> ラットリンパ節T細胞の増殖誘導

(1)抗CD3抗体（クローンG4.18；50ng/well）と抗CD28抗体（クローンJJ319；種々濃度；Pharmingen製）をコーティングしたマイクロプレート、(2)抗CD3抗体（50ng/well）及び抗AILIM抗体（各種濃度）をコーティングしたマイクロプレート、及び(3)抗CD3抗体（50ng/well）及び陰性対照抗体MOPC21（種々濃度；Pharmingen製）をコーティングしたマイクロプレートの各々に、10%FCS含有RPMI1640培地中に分散したラットリンパ節T細胞（ $1 \times 10^5$ 個/well）を加え37°Cで44時間培養し、培養終了6時間前に $0.5 \mu\text{Ci}/\text{well}$ のトリチウム標識チミジン（ $^3\text{H-TdR}$ ）を加えた。培養後、細胞を回収し、TOPCOUNT（PACKARD製）にてリチウム標識チミジン（ $^3\text{H-TdR}$ ）の細胞への取込量を測定し、該取込量を指標として細胞増殖の程度を解析した。

結果を図36に示す。本試験により下記の結果が得られた。

ラットリンパ節T細胞は、抗CD3抗体単独による刺激のみでは増殖誘導されない

ものの、抗CD3抗体と抗AILIM抗体による刺激及び抗CD3抗体と抗CD28抗体による刺激のいずれの刺激によっても有意に増殖した。また、該増殖は、プレートにコーティングした抗AILIM抗体または抗CD28抗体の濃度に依存するものであった。

## 【0177】

## 実施例4 抗AILIM抗体による関節症の治療効果

## &lt;4-1&gt; 抗AILIM抗体の複数回投与試験

Wistarラット（雄、5週齢、チャールズリバー製）に、流動パラフィンで10mg/mlに調製した結核死菌（M.Tuberculosis H37Ra; Difco）をアジュバントとして用い、0.1ml/匹の濃度で尾根部に皮内投与し（1mg/0.1ml/匹）関節症を誘導した。アジュバント投与日（0日）から7日後に両後肢足容積をプレシズモーメーターで測定し、両後肢足容積を指標に群分けした（各群8匹）。

アジュバント投与日（0日）から7日後に、その内の1群に抗ラットAILIM抗体（JTT-2抗体；JMab50とも別称する；20mg/kg）を静注した。該抗体は、初回投与の後は1週間に2回の割合で初回投与から20日目まで投与した。アジュバント投与から経時的に両後肢足容積をプレシズモーメーターで測定した。

なお、アジュバント及び抗体のいずれも投与しない正常ラット群（4匹）、及び陰性対照として抗ラットAILIM抗体の代わりにマウス抗ヒトCETP抗体（クローニJHC1；JMab109とも別称する；日本特許出願公開第9-20800号公報）を同様にして投与した群を対照とし、同様にしてプレシズモーメーターで両後肢足容積を測定した。

結果を図15に示す。

驚くべきことに、抗AILIM抗体を投与群では、足腫れが完全に抑制され、関節炎を誘導していない正常ラット群とほぼ同じ結果であった。

## 【0178】

## &lt;4-2&gt; 抗AILIM抗体の単回投与試験（その1）

前記で得た結果に基づき、抗AILIM抗体の単回投与による関節炎の治療効果を前記と同様にして検討した。

但し、本試験においては、抗AILIM抗体または陰性対照抗体の投与は、アジュバント投与日（0日）から3、5または7日後に、抗ラットAILIM抗体（JTT-2抗

体；JMab50とも別称する；20mg/kg) または陰性対照抗ラットCETP抗体 (JHC1；20mg/kg) を一回のみ静注した。

結果を図37に示す。

抗AILIM抗体の投与が単回であるにも拘らず、アジュバント投与から3、5及び7日目のいずれの単回投与によっても、足腫れが有意に抑制され、特にアジュバント投与から7日目に抗AILIM抗体を投与した群では、足腫れがほぼ100%抑制された。この抑制の程度は、関節炎を誘導していない正常ラット群の値とほぼ同じであった。

#### 【0179】

##### <4-3> 抗AILIM抗体の単回投与試験（その2）

前記<4-2>の結果に基づき、本試験で用いた関節炎モデルにおいて抗AILIM抗体が関節炎治療効果を発揮するための抗AILIM抗体の用量を前記と同様の方法により検討した。

本試験においては、アジュバント投与から7日目に、抗ラットAILIM抗体 (JTT-2抗体；JMab50とも別称する) を、1、3、10または20mg/kgの濃度で1回のみ静注した。

また、比較のため、JTT-2とは別の抗ラットAILIM抗体 (JTT-1；JMab-49と別称する；20mg/kg) を同様に単回投与した。

陰性対照については、抗ラットCETP抗体 (JHC1；20mg/kg) を一回のみ静注した。

結果を図38に示す。

抗AILIM抗体を1、3、10または20mg/kgのいずれの用量で単回投与した場合でも、足腫れがほぼ100%抑制され、関節炎を誘導していない正常ラットと同様のレベルまで抑制した。また、驚くべきことに、この抑制効果は、極めて低用量である1mg/kgでも発揮されていた。

#### 【0180】

##### 実施例5 抗AILIM抗体による肝炎の治療効果

C57BL/6マウスに、*P.acnes* (*Propionibacterium acnes*) のリン酸緩衝液 (PBS) 溶液を静注した。*P.acnes*投与(0日)から1週間後、該マウスにLPS (Lipopopolysaccharide) を静注した。

ysaccharide) のPBS溶液を静注し肝炎を誘発した。LPS投与の6.5時間後に眼底より採血し、血漿中のIFN- $\gamma$ の濃度をELISAにより測定した。また、血漿中のGPT (glutamic-oxaloacetic transaminase) 及びGOT (glutamic-pyruvic transaminase) の濃度を生化学検査装置 (Fara) で測定した。

*P.acnes*投与 (0日) から1、2及び3日目に、抗マウスAILIMモノクローナル抗体 (B10.5抗体；5, 50, 500  $\mu\text{g}$ /匹) を腹腔内投与し、抗AILIM抗体による肝炎の改善効果を評価した。

なお、抗マウスAILIM抗体を投与しない群を対照とした。

結果を図16及び図17に示す。

抗AILIM抗体の投与により、抗体濃度依存的に血中のIFN- $\gamma$ の上昇が有意に抑制された。また抗AILIM抗体 (50  $\mu\text{g}$ /匹) を投与した場合に、GOT及びGPTの上昇が有意に抑制された。

#### 【0181】

#### 実施例6 抗AILIM抗体による移植片対宿主病 (GVHD) の治療効果

##### <6-1> 試験1

BALB/cマウスとC57BL/6マウスを交配して得たF1マウス (8乃至10週齢、3匹) に、BALB/cマウスの脾臓細胞 ( $8 \times 10^7$  個/匹) を静注しGVHDを誘導した。該脾臓細胞投与直後 (0時間) 及び12時間後の各々に抗マウスAILIMモノクローナル抗体 (B10.5抗体；400  $\mu\text{g}$ /匹) を静注し、該脾臓細胞投与の24、48及び72時間後の各々に同B10.5抗体 (200  $\mu\text{g}$ /匹) を腹腔内投与した。

該脾臓細胞投与直後 (0日) 、1、2、3及び6週間後の各々に採血し、血清中のIgG1、IgE及び抗dsDNA抗体値を常法により測定した。なお、抗dsDNA抗体値の単位は、自己免疫疾患自然発症マウスの血清中の抗dsDNA抗体をスタンダードとして標準化した。

また、抗AILIM抗体の代わりに、hCTLA4-Ig (ヒトCTLA4の可溶性領域と免疫グロブリンの定常領域とからなる融合蛋白) を同様にして投与した群を陽性対照とした。また、抗AILIM抗体の代わりにPBSを同様にして投与した群を陰性対照とした。

結果を図18、図19及び図20に示す。

抗AILIM抗体を投与した群では、陰性対照群に比べ、GVH反応 (graft versus host reaction) の指標である血清中のIgGの上昇、IgEの上昇、及び抗dsDNA抗体値の上昇が有意に抑制された。また、その抑制の効果は、hCTLA4-Igを投与した陽性対照群の値とほぼ同等であった。

### 【0182】

#### <6-2> 試験2

BALB/cマウスとC57BL/6マウスを交配して得たF1マウス（8乃至10週齢、3匹）に、BALB/cマウスの脾臓細胞 ( $1 \times 10^8$ 個/匹) を静注しGVHDを誘導した。該脾臓細胞投与直後（0時間）及び12時間後の各々に抗マウスAILIMモノクローナル抗体（B10.5抗体； $200 \mu\text{g}$ /匹）を静注し、該脾臓細胞投与の24、48及び72時間後の各々に同B10.5抗体（ $100 \mu\text{g}$ /匹）を腹腔内投与した。

該脾臓細胞投与直後（0日）、1、2、3、6、9及び12週間後の各々に採血し、血清中のIgG1、IgE及び抗dsDNA抗体値を常法により測定した。なお、抗dsDNA抗体値の単位は、自己免疫疾患自然発症マウスの血清中の抗dsDNA抗体をスタンダードとして標準化した。

また、抗AILIM抗体の代わりに、hCTLA4-Ig（ヒトCTLA4の可溶性領域と免疫グロブリンの定常領域とからなる融合蛋白）を同様にして投与した群を陽性対照とした。また、抗AILIM抗体の代わりにPBSを同様にして投与した群を陰性対照とした。

結果を図39、図40及び図41に示す。

抗AILIM抗体を投与した群では、陰性対照群に比べ、GVH反応 (graft versus host reaction) の指標である血清中のIgGの上昇、IgEの上昇、及び抗dsDNA抗体値の上昇が有意に抑制された。また、その抑制の効果は、hCTLA4-Igを投与した陽性対照群の値とほぼ同等であった。

### 【0183】

#### 実施例7 抗AILIM抗体による抗外来抗原抗体産生の抑制効果

##### <7-1> 羊赤血球(SRBC)で免疫感作したマウスでの抗SRBC抗体の産生の抗AILIM抗体による抑制効果

BALB/cマウス（雌、5週齢）に、羊赤血球(SRBC; Sheep red blood cell; 1

$\times 10^8$ 個/匹)を静注した。SRBC投与(0日)の直後またはSRBC投与から7日後に抗マウスAILIMモノクローナル抗体(B10.5抗体; 50または500μg/匹)を静注した。SRBC投与から経時的に採血し血清中の抗SRBC抗体の產生量を常法に従ってELISAにより測定した。

なお、抗AILIM抗体の代わりに、hCTLA4-Ig(ヒトCTLA4の可溶性領域と免疫グロブリンの定常領域とからなる融合蛋白)を同様にして投与した群を陽性対照とした。また、抗AILIM抗体の代わりにPBSを同様にして投与した群を陰性対照とした。

結果を図21及び図22に示す。

抗AILIM抗体を投与した群では、該抗体をSRBCによる感作直後投与した群においてもまた7日後に投与した群においても、陰性対照群に比べ、外来抗原としてのSRBCに特異的なIgG抗体の產生が有意に抑制された。また、その抑制の効果は、hCTLA4-Igを投与した陽性対照群の値よりも高いものであった。

一方、hCTLA4-Igを投与した群では、該hCTLA4-IgをSRBCによる感作直後に投与した群では、陰性対照に比べ抗SRBC抗体の產生が有意に抑制されたものの、SRBC感作から7日後の投与では有意な抑制は見られたかった。

#### 【0184】

<7-2> NP-KLHで免疫感作したマウスでの抗NP-KLH抗体の產生の抗AILIM抗体による抑制効果

C57BL/6マウスに、CFA(完全フロイントアジュバント)及びNP-KLH(KLH(key hole limpet hemocyanin)にハプテンであるNP(Nitrophenol)を結合させたもの。

100μg/マウス)を腹腔内投与した。該抗原の投与の直後(0時間)及び12時間後の各々に、抗マウスAILIM抗体(クローンB10.5またはB9.B6のいずれか; 200μg/マウス)を尾静脈に投与した。また、該抗原投与から24及び48時間後の各々に該抗AILIM抗体のいずれかを腹腔内投与した。

NP-KLH投与から経時的に採血し血清中のNP-KLHに特異的な抗体(IgG1、IgG2a、IgG2b及びIgMの各々)の產生量を常法に従ってELISAにより測定した。なお、該ELISAには、NPを結合させた牛血清アルブミン(BSA)をキャプチャーアン原とし

て用いた。

なお、陰性対照としては、リン酸緩衝液を用い、また陽性対照としては、hCTLA4-Ig（ヒトCTLA4の可溶性領域と免疫グロブリンの定常領域とからなる融合蛋白）を用いて上記と同様にして試験した。

結果を図42、図43、図44、図45及び図46に示す。

陰性対照抗体の投与群では、抗NP-KLH抗体の産生が経時に上昇しており、該陰性対照抗体は抗NP-KLH抗体の産生を抑制しなかった。

一方、抗AILIM抗体投与群では、抗NP-KLH抗体の産生もが有意に抑制され、この抑制効果は、陽性対照であるCTLA4-IgFcによる抗NP-KLH抗体の抑制効果とほぼ同じであった。

また、抗AILIM抗体投与群では、IgG1、IgG2a、IgG2b及びIgMのいずれの抗体クラスに属する抗NP-KLH抗体の産生もが有意に抑制された。

#### 【0185】

#### 実施例8 抗AILIM抗体の混合リンパ球反応（MLR）の制御活性の解析

抗AILIM抗体が、T細胞反応（IFN- $\gamma$ やIL-4などのサイトカインの産生、及び細胞増殖など）を制御（促進及び／または抑制）する能力を有するか否か、即ちAILIMを介したコスティミュレイトリーシグナル（co-stimulatory signal）の細胞内への伝達の制御能を有するか否かを、アロジエニック混合リンパ球反応（allogenic mixed lymphocyte reaction; allogenic MLR）におけるT細胞の増殖（即ち、細胞内でのDNA合成）を制御する活性の有無を指標に解析した。

#### 【0186】

#### <8-1> ヒトPBMC及びT細胞の調製

健常人（7人；ドナーA, B, C, D, E, F及びG）の各々から採取した各々の末梢血（200ml）を、マイクロチューブ（50ml；Falcon製）に分注したLymphoprep（15ml；Nycomed製）に重層した。次いで、遠心分離（1600回転、10分）の後、中間層を回収した。回収した細胞を、リン酸緩衝液で2倍以上に希釀した後、遠心分離（1,800回転、10分）して、PBMC（末梢血单核球細胞； $2 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 細胞）を調製した。血球計数板を用いて細胞数を計数し、MLR試験に必要な細胞数（ $1.08 \times 10^8$ 細胞／9マイクロプレート）を分取し、氷上に保存した。残りの細

胞は、以下のT細胞の分離に用いた。

PBMCからのT細胞の分離には、PanT Isolationキット (Miltenyi Biotech製) を用いた。該キットの添付の実験操作マニュアルに従って、該残りのPBMCを、該キットに付属の溶液に添加し、反応させた。次いで、細胞を5mMのEDTA及び0.5% BSA含有PBSで洗浄した後、該PBS中に再懸濁した。次いで、該細胞懸濁液を、該PBSで膨潤させたPositive Selection Column VS+ (Miltenyi Biotech製) に添加し、非吸着画分を回収した。また、該カラムに該PBSを添加して、洗浄液を回収した。同様の操作を再度行った。回収液を併せて、T細胞画分とした。該T細胞画分を、遠心した後、該PBS中に再懸濁した。得られたT細胞の細胞数を、血球計数板を用いて計数し、以下の試験に用いた。

#### 【0187】

##### 〈8-2〉 混合リンパ球反応 (MLR)

先に述べたとおり、T細胞等のリンパ球の活性化に必要なコスティミュレートリーシグナルの伝達経路には、既に比較的十分な解析がなされているCD28とCD80 (B7-1)/CD86 (B7-2)との間のシグナル伝達経路、及びCTLA4とCD80 (B7-1)/CD86 (B7-2)との間のシグナル伝達経路の2つの経路が知られている。

即ち、混合リンパ球反応 (MLR) におけるT細胞の増殖は、該既知の2つの経路を介するシグナル伝達によっても誘導される。

従って、本試験では、下記の被験物質を用いて、(1) CTLA4を介するシグナル伝達経路の遮断によるMLRの抑制、(2) CD80 (B7-1)/CD86 (B7-2)を介するシグナル伝達経路の遮断によるMLRの抑制、及び(3) AILIMが担う第3のシグナル伝達経路の遮断によるMLRの抑制の各々について解析した。

#### 【0188】

下記を、被験物質として用いた。

- (1) 抗ヒトAILIMマウスモノクローナル抗体SA12 (前記実施例に同じ)。
- (2) マウスIgG抗体 (抗ヒトCD34; 隆性対照; Immunotech製)。
- (3) 抗ヒトCD80モノクローナル抗体 (Pharmingen製) と抗ヒトCD86モノクローナル抗体 (Pharmingen製) との混合物。
- (4) ヒトCTLA4-IgFcキメラ分子 (Ancell製)。

## 【0189】

前記<8-1>で得た各ドナーから調製したPBMC及びT細胞を用いて、下記の6通りの組み合わせによる混合リンパ球反応（MLR）を行った。

- (i) T細胞（ドナーA）／PBMC（ドナーD）
- (ii) T細胞（ドナーD）／PBMC（ドナーB）
- (iii) T細胞（ドナーC）／PBMC（ドナーA）
- (iv) T細胞（ドナーE）／PBMC（ドナーG）
- (v) T細胞（ドナーF）／PBMC（ドナーE）
- (vi) T細胞（ドナーG）／PBMC（ドナーF）

試験に用いるPBMC及びT細胞は、下記の濃度に調整した。

PBMCをPBS中に分散した後、培養皿（60mm）移し、放射線照射装置（日立メディコ製）でX線照射（50Gy）した。細胞を回収して遠心した後、10%FCS含有RPMI1640培地に加え、細胞数を、 $2 \times 10^5$ 細胞／ $50\mu l$ に調整した。

また、上記で得た各々のドナーからのT細胞を、10%FCS含有RPMI1640培地に加え、細胞数を、 $1 \times 10^5$ 細胞／ $50\mu l$ に調整した。

## 【0190】

## &lt;8-2-1&gt; MLRに対する抗AILIM抗体によるMLRの抑制

96穴U底マイクロプレートの各ウェルに10%FCS含有PRMI1640培地を加えた後、10%FCS含有RPMI1640培地で各種濃度に希釈した抗ヒトAILIMマウスモノクローナル抗体SA12の溶液を加えた（最終濃度：0、0.31、1.25、5及び $20\mu g/ml$ ）。次いで、T細胞（ $50\mu l$ ）を加え、CO<sub>2</sub>インキュベーター（NAPCO製）内で、37°Cで1時間培養した。反応終了後、別のドナー由来のPBMC（ $50\mu l$ ）を加え、MLRを開始させた。

なお、被験物質として抗ヒトAILIM抗体以外を用いた場合のMLRは、PBMCと該被験物質との培養の後に、別のドナー由来のT細胞を加えて反応を行った。

培養の5日目に、各ウェルに、10%FCS含有RPMI1640培地で希釈したトリチウム標識チミジン（<sup>3</sup>H-Thymidine； $20\mu l$ ； $1\mu Ci/well$ ）を添加した後さらに1日培養して。培養後、Cell Harvester（Packard製）を用いて細胞を回収し、βカウンター（TOP COUNT；Packard製）を用いて、細胞に取込まれている<sup>3</sup>Hの放射活性

を測定し、培養後のT細胞の増殖の程度を解析した。

結果を図47、図48、図49、図50、図51、及び図52に示す。

【0191】

この結果、下記が明らかとなった。

- (1) CTLA4-IgFcは、CTLA-4を介するシグナル伝達を遮断することによりアロジエニックMLRによるT細胞の増殖を抑制する。
- (2) 抗CD80抗体及び抗CD86抗体は、CTLA4及びCD28のリガンドであるCD80/CD86を介するシグナル伝達を阻害することによりアロジエニックMLRによるT細胞の増殖を抑制される。
- (3) CTLA4-IgFc、抗CD80抗体及び抗CD86抗体と同様に、ヒトAILIMに対する抗体が抗体濃度依存的に、AILIMを介するシグナル伝達によるアロジエニックMLRでのT細胞の増殖を有意に抑制する。
- (4) 抗AILIM抗体によるMLRの抑制は、いずれのドナー由来のPBMC及びT細胞での組合せにおいても有意に認められる。

この結果は、即ち、T細胞の活性化に必要なコスティミュレイトーシグナルの伝達経路には、既知のCTLA4/CD80/CD86を介する経路及びCD28/CD80/CD86を介する経路の他に、AILIMとそのリガンドを介する第3の経路が存在すること、並びに該AILIMを介するシグナル伝達経路が、AILIMに対する抗体により阻害されることを示すものである。

さらに、該シグナル伝達におけるAILIMを介する経路の貢献度は、CTLA4/CD80/CD86を介する経路及びCD28/CD80/CD86を介する経路のそれと同程度である可能性が示された。

【0192】

【発明の効果】

本発明の医薬組成物は、T細胞等のリンパ球の活性化並びに活性化リンパ球の機能制御の異常に起因する下記に挙げるような種々の自己免疫性疾患、アレルギー性疾患または炎症性疾患の治療及び予防に有用である。

【0193】

該疾患としては例えば、関節症（例えば、関節リウマチ、変形性関節症など）

、炎症（例えば、脳炎、気管支炎、血管炎、肺炎、肝炎、心筋炎、脾炎、腸炎、胃炎、腹膜炎、腎炎（糸球体腎炎など）、関節炎（関節リウマチなど）、虚血後再灌流障害（心筋虚血再灌流障害など）における炎症、移植後免疫拒絶に起因する炎症、炎症性腸疾患、火傷、多発性臓器障害における炎症、PTCAやPTCRの術後における炎症、及び動脈硬化症に伴う炎症など）、細菌やウイルスによる感染により惹起される種々の症状（例えば、炎症）、移植片対宿主反応、移植片対宿主反応、組織や臓器の移植に伴う免疫拒絶反応、外来抗原による免疫感作により惹起される該抗原に対する抗体の過剰産生を伴う種々の疾患、多発性硬化症、自己免疫性甲状腺炎、種々の皮膚疾患（例えば、アレルギー性接触性皮膚炎、慢性炎症性皮膚疾患である扁平苔癬、乾癬、強皮症）、全身性エリテマトーデスなどが挙げられる。

また、本発明の医薬組成物に含まれるAILIMに対するヒト抗体を含んでなる医薬組成物は、マウス由来の抗体をヒトに投与する際のアレルギー等の副作用を全く惹起しないことから医薬品として極めて有用である。

#### 【0194】

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

正常マウス胸腺由来T細胞におけるCD3、CD28及びAILIM（ThAと別称する）の発現状態を示す図。

分図（a）はCD3及びAILIM（ThAと別称する）の発現状態を示す。分図（b）はCD3及びCD28の発現状態を示す。

##### 【図2】

正常マウス胸腺由来T細胞でのCD28及びAILIMの発現状態を、CD4及びCD8の発現を指標としたT細胞の分化の各段階毎に示す図。

R2乃至R8は、各々下記を示す。

R2：CD4陰性CD8陰性T細胞でのAILIM及びCD28の発現状態。

R3：CD4弱陽性CD8弱陽性T細胞でのAILIM及びCD28の発現状態。

R4：CD4陽性CD8陽性T細胞でのAILIM及びCD28の発現状態。

R5：CD4陽性CD8弱陽性T細胞でのAILIM及びCD28の発現状態。

R6 : CD4陽性CD8陰性T細胞でのAILIM及びCD28の発現状態。

R7 : CD4弱陽性CD8陽性T細胞でのAILIM及びCD28の発現状態。

R8 : CD4陰性CD8陽性T細胞でのAILIM及びCD28の発現状態。

【図3】

正常マウス脾臓組織に含まれるCD4陽性T細胞におけるAILIMの発現状態を示す図。

【図4】

肝炎を罹患した宿主の肝臓組織浸潤CD4陽性T細胞におけるAILIMの発現状態を示す図。

【図5】

関節リウマチ患者の末梢血中T細胞及び関節腔浸潤T細胞の各々に含まれるCD4陽性T細胞及びCD4陰性T細胞の各々におけるAILIM及びCD28の発現状態を示す図。

【図6】

種々の刺激剤で刺激して活性化した正常マウスのリンパ組織由来T細胞における、AILIMの発現状態を経時的に示す図。

【図7】

マウスの各種T細胞株及びT細胞由来ハイブリドーマでのAILIMの発現状態並びに他の種々の性状を概略的に示す図。

【図8】

抗CD3抗体と抗AILIM抗体をコーティングしたプレートを用いて再現したCD3とAILIMのクロスリンクによる、マウス脾臓由来T細胞の活性化能（IFN $\gamma$ の産生誘導能）を示す図。

【図9】

抗CD3抗体と抗AILIM抗体をコーティングしたプレートを用いて再現したCD3とAILIMのクロスリンクによる、ラット脾臓由来T細胞の活性化能（IFN $\gamma$ 産生誘導能）を示す図。

【図10】

抗CD3抗体と抗AILIM抗体をコーティングしたプレートを用いて再現したCD3とA

ILIMのクロスリンクによる、ヒト末梢血由来T細胞の活性化能（IFN- $\gamma$ 産生誘導能）を示す図。

## 【図11】

抗CD3抗体による刺激により活性化したヒト末梢血由来T細胞における、T細胞反応の1つであるIFN- $\gamma$ の産生の上昇に対する抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

## 【図12】

抗CD3抗体による刺激により活性化したヒト末梢血由来T細胞における、T細胞反応の1つであるIL-4の産生の上昇に対する抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

## 【図13】

抗CD3抗体による刺激により活性化したマウス胸腺由来T細胞における、T細胞反応の1つであるIL-4の産生の上昇に対する抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

## 【図14】

抗CD3抗体による刺激により活性化したマウス脾臓由来T細胞における、T細胞反応の1つであるIL-4の産生の上昇に対する抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

## 【図15】

関節症宿主における関節症のパラメーターである足腫れに対する抗AILIM抗体の複数回投与による治療効果を示す図。

## 【図16】

肝炎宿主における病状悪化のパラメーターであるIFN- $\gamma$ の産生の上昇に対する抗AILIM抗体による治療効果を示す図。

## 【図17】

肝炎宿主における病状悪化のパラメーターであるGPT及びGOTの産生の上昇に対する抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

## 【図18】

移植片対宿主病（GVHD）の移植変対宿主反応（GVH反応）の1つであるIgGの産

生の上昇に対する抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

【図19】

移植片対宿主病（GVHD）の移植変対宿主反応（GVH反応）の1つであるIgEの產生の上昇に対する抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

【図20】

移植片対宿主病（GVHD）の移植変対宿主反応（GVH反応）の1つである抗dsDNA抗体値の上昇に対する抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

【図21】

外来抗原であるSRBCで免疫感作された宿主の生体での該外来抗原に対する抗体の產生の抗AILIM抗体（抗原感作直後に投与）による抑制効果を示す図。

【図22】

外来抗原であるSRBCで免疫感作された宿主の生体での該外来抗原に対する抗体の產生の抗AILIM抗体（抗原感作7日目に投与）による抑制効果を示す図。

【図23】

正常組織（胸腺、リンパ節及び末梢血）並びに病変部位でのAILIMの発現状態、並びにCD28の発現状態を模式的に示す図。

【図24】

健常人末梢血由来T細胞及び該T細胞から分離したAILIM陽性細胞におけるAILIM、CD28、CD4、CD8、CD19、及びCTLA-4の各々の発現状態を示す図。

分図(a)は、末梢血由来T細胞の種々細胞の分布を示す。

分図(b)は、末梢血由来T細胞から分離したAILIM陽性細胞の分布を示す。

分図(c)は、末梢血由来T細胞におけるCD4及びCD8の発現状態を示す。

分図(d)は、末梢血由来T細胞から分離したAILIM陽性細胞におけるCD4及びCD8の発現状態を示す。

分図(e)は、末梢血由来T細胞におけるAILIM及びCD4の発現状態を示す。

分図(f)は、末梢血由来T細胞から分離したAILIM陽性細胞におけるAILIM及びCD4の発現状態を示す。

分図(g)は、末梢血由来T細胞におけるAILIM及びCD28の発現状態を示す。

分図(h)は、末梢血由来T細胞から分離したAILIM陽性細胞におけるAILIM及びCD

28の発現状態を示す。

分図(i)は、末梢血由来T細胞におけるAILIM及びCTLA-4の発現状態を示す。

分図(j)は、末梢血由来T細胞から分離したAILIM陽性細胞におけるAILIM及びCTLA-4の発現状態を示す。

分図(k)は、末梢血由来T細胞におけるAILIM及びCD19の発現状態を示す。

分図(l)は、末梢血由来T細胞から分離したAILIM陽性細胞におけるAILIM及びCD19の発現状態を示す。

【図25】

健常人末梢血に由来するT細胞、CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、該各々のT細胞から分離したAILIM陽性細胞の各々におけるAILIMの発現の強さを示す図。

分図(a)は、末梢血T細胞及び該T細胞から分離したAILIM陽性細胞の各々におけるAILIMの発現の強さを示す。

分図(b)は、末梢血CD4陽性T細胞及び該T細胞から分離したCD4陽性AILIM陽性T細胞の各々におけるAILIMの発現の強さを示す。

分図(c)は、末梢血CD8陽性T細胞及び該T細胞から分離したCD8陽性AILIM陽性T細胞の各々におけるAILIMの発現の強さを示す。

【図26】

慢性関節リウマチ(RA)及び変性性関節炎(OA)に罹患している患者の各々の末梢血由来T細胞及び関節腔液由来T細胞、並びに進行性全身性硬化症(強皮症;PSS)、及び全身性エリテマトーデス(SLE)に罹患している患者の各々の末梢血T細胞の各々におけるAILIMの発現状態を示す図。

【図27】

アジュバント誘発関節炎モデルラットの胸腺、脾臓、リンパ節及び末梢血の各々に由来するT細胞(CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞)におけるAILIMの発現状態を示す図。

【図28】

各種の刺激で活性化させた健常人末梢血由来T細胞におけるAILIM及びCTLA-4の各々の発現状態を示す図。

分図(a)は、PMA及びIonophoreの刺激により活性化したT細胞におけるAILIMの

発現の強さを示す。

分図(b)は、PMA及びIonophoreの刺激により活性化したT細胞におけるCTLA-4の発現の強さを示す。

分図(c)は、PMA及びIonophoreの刺激により活性化したCD4陽性T細胞におけるAILIMの発現の強さを示す。

分図(d)は、PMA及びIonophoreの刺激により活性化したCD4陽性T細胞におけるCTLA-4の発現の強さを示す。

分図(e)は、抗CD3抗体と抗AILIM抗体による刺激または抗CD3抗体と抗CD28抗体による刺激で活性化したT細胞におけるAILIMの発現の強さを示す。

分図(f)は、抗CD3抗体と抗AILIM抗体による刺激または抗CD3抗体と抗CD28抗体による刺激で活性化したT細胞におけるCTLA-4の発現の強さを示す。

【図29】

種々の抗体の刺激によるヒト末梢血T細胞における種々サイトカインの産生誘導能を示す図。

【図30】

種々濃度の種々の抗体の刺激によるヒト末梢血T細胞の細胞増殖誘導能を示す図。

【図31】

種々抗体の刺激によるヒト末梢血T細胞の経時的な細胞増殖誘導能を示す図。

【図32】

抗CD3抗体及び抗AILIM抗体をコーティングしたマイクロプレート中の培養におけるマウス脾臓細胞及びマウス脾臓由来T細胞の各々の増殖の程度を示す図。

分図(a)は、マウス脾臓細胞の増殖の程度を示す。

分図(b)は、マウス脾臓由来T細胞の増殖の程度を示す。

【図33】

抗CD3抗体(濃度一定)及び抗AILIM抗体(各種濃度)をコーティングしたマイクロビーズ(濃度一定)を用いた培養におけるマウス脾臓細胞の各々の増殖の程度を示す図。

## 【図34】

抗CD3抗体（濃度一定）及び抗AILIM抗体（濃度一定）をコーティングしたマイクロビーズ（種々濃度）を用いた培養にいにおけるマウス脾臓細胞の増殖の程度を示す図。

## 【図35】

抗CD3抗体（濃度一定）及び抗AILIM抗体（濃度一定）をコーティングしたマイクロビーズ（種々濃度）を用いた培養にいにおけるマウス脾臓由来T細胞の増殖の程度を示す図。

## 【図36】

種々濃度の種々の抗体の刺激によるラットリンパ節由来T細胞の細胞増殖誘導能を示す図。

## 【図37】

関節症宿主における関節症のパラメーターである足腫れに対する抗AILIM抗体の単回投与（濃度一定）による治療効果を示す図。

## 【図38】

関節症宿主における関節症のパラメーターである足腫れに対する抗AILIM抗体の単回投与（種々濃度）による治療効果を示す図。

## 【図39】

移植片対宿主病（GVHD）の移植変対宿主反応（GVH反応）の1つであるIgGの産生の上昇に対する抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

## 【図40】

移植片対宿主病（GVHD）の移植変対宿主反応（GVH反応）の1つであるIgEの産生の上昇に対する抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

## 【図41】

移植片対宿主病（GVHD）の移植変対宿主反応（GVH反応）の1つである抗dsDNA抗体値の上昇に対する抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

## 【図42】

外来抗原であるNP-KLHで免疫感作された宿主の生体での該外来抗原に対するIgG1抗体の產生の抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

## 【図43】

外来抗原であるNP-KLHで免疫感作された宿主の生体での該外来抗原に対するIgM抗体の產生の抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

## 【図44】

外来抗原であるNP-KLHで免疫感作された宿主の生体での該外来抗原に対するIgG1抗体の產生の抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

## 【図45】

外来抗原であるNP-KLHで免疫感作された宿主の生体での該外来抗原に対するIgG2b抗体の產生の抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

## 【図46】

外来抗原であるNP-KLHで免疫感作された宿主の生体での該外来抗原に対するIgG2a抗体の產生の抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

## 【図47】

健常人「ドナーA」のT細胞を健常人「ドナーD」のPBMCと培養した場合の混合リンパ球反応（MLR）での該T細胞の増殖試験における、種々の対照被験物質による該T細胞の増殖の抑制効果を示す図。

縦軸は細胞増殖の程度の指標としての [ $^3\text{H}$ ] チミジンの細胞内への取込み量を示し、横軸は該被験物質の濃度を示す。

なお、図中の各種表記は下記を意味する。

「CD80+86」：抗CD80抗体と抗CD86抗体との混合物。

「mIgG1」：抗ヒトCD34/IgG1マウスモノクローナル抗体。

「CTLA4-Ig」：ヒトCTLA4-IgFcキメラ分子。

「SA12」：抗ヒトAILIMマウスモノクローナル抗体。

## 【図48】

健常人「ドナーD」のT細胞を健常人「ドナーB」のPBMCと培養した場合の混合リンパ球反応（MLR）での該T細胞の増殖試験における、種々の対照被験物質による該T細胞の増殖の抑制効果を示す図。

縦軸は細胞増殖の程度の指標としての [ $^3\text{H}$ ] チミジンの細胞内への取込み量を示し、横軸は該被験物質の濃度を示す。

なお、図中の各種表記は下記を意味する。

- 「CD80+86」：抗CD80抗体と抗CD86抗体との混合物。
- 「mIgG1」：抗ヒトCD34/IgG1マウスモノクローナル抗体。
- 「CTLA4-Ig」：ヒトCTLA4-IgFcキメラ分子。
- 「SA12」：抗ヒトAILIMマウスモノクローナル抗体。

#### 【図49】

健常人「ドナーC」のT細胞を健常人「ドナーA」のPBMCと培養した場合の混合リンパ球反応（MLR）での該T細胞の増殖試験における、種々の対照被験物質による該T細胞の増殖の抑制効果を示す図。

縦軸は細胞増殖の程度の指標としての [<sup>3</sup>H]チミジンの細胞内への取込み量を示し、横軸は該被験物質の濃度を示す。

なお、図中の各種表記は下記を意味する。

- 「CD80+86」：抗CD80抗体と抗CD86抗体との混合物。
- 「mIgG1」：抗ヒトCD34/IgG1マウスモノクローナル抗体。
- 「CTLA4-Ig」：ヒトCTLA4-IgFcキメラ分子。
- 「SA12」：抗ヒトAILIMマウスモノクローナル抗体。

#### 【図50】

健常人「ドナーE」のT細胞を健常人「ドナーG」のPBMCと培養した場合の混合リンパ球反応（MLR）での該T細胞の増殖試験における、種々の対照被験物質による該T細胞の増殖の抑制効果を示す図。

縦軸は細胞増殖の程度の指標としての [<sup>3</sup>H]チミジンの細胞内への取込み量を示し、横軸は該被験物質の濃度を示す。

なお、図中の各種表記は下記を意味する。

- 「control mIgG」：抗ヒトCD34/IgG1マウスモノクローナル抗体。
- 「CD80+86 Ab」：抗CD80抗体と抗CD86抗体との混合物。
- 「SA12」：抗ヒトAILIMマウスモノクローナル抗体。
- 「CTLA4-Ig」：ヒトCTLA4-IgFcキメラ分子。

#### 【図51】

健常人「ドナーF」のT細胞を健常人「ドナーE」のPBMCと培養した場合の混

合リンパ球反応（MLR）での該T細胞の増殖試験における、種々の対照被験物質による該T細胞の増殖の抑制効果を示す図。

縦軸は細胞増殖の程度の指標としての [<sup>3</sup>H] チミジンの細胞内への取込み量を示し、横軸は該被験物質の濃度を示す。

なお、図中の各種表記は下記を意味する。

「control mIgG」：抗ヒトCD34/IgG1マウスモノクローナル抗体。

「CD80+86 Ab」：抗CD80抗体と抗CD86抗体との混合物。

「SA12」：抗ヒトAILIMマウスモノクローナル抗体。

「CTLA4-Ig」：ヒトCTLA4-IgFcキメラ分子。

【図52】

健常人「ドナーG」のT細胞を健常人「ドナーF」のPBMCと培養した場合の混合リンパ球反応（MLR）での該T細胞の増殖試験における、種々の対照被験物質による該T細胞の増殖の抑制効果を示す図。

縦軸は細胞増殖の程度の指標としての [<sup>3</sup>H] チミジンの細胞内への取込み量を示し、横軸は該被験物質の濃度を示す。

なお、図中の各種表記は下記を意味する。

「control mIgG」：抗ヒトCD34/IgG1マウスモノクローナル抗体。

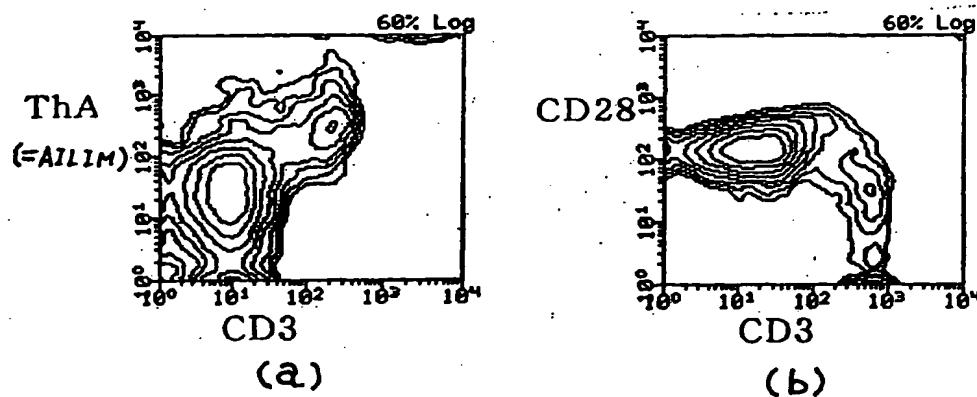
「CD80+86 Ab」：抗CD80抗体と抗CD86抗体との混合物。

「SA12」：抗ヒトAILIMマウスモノクローナル抗体。

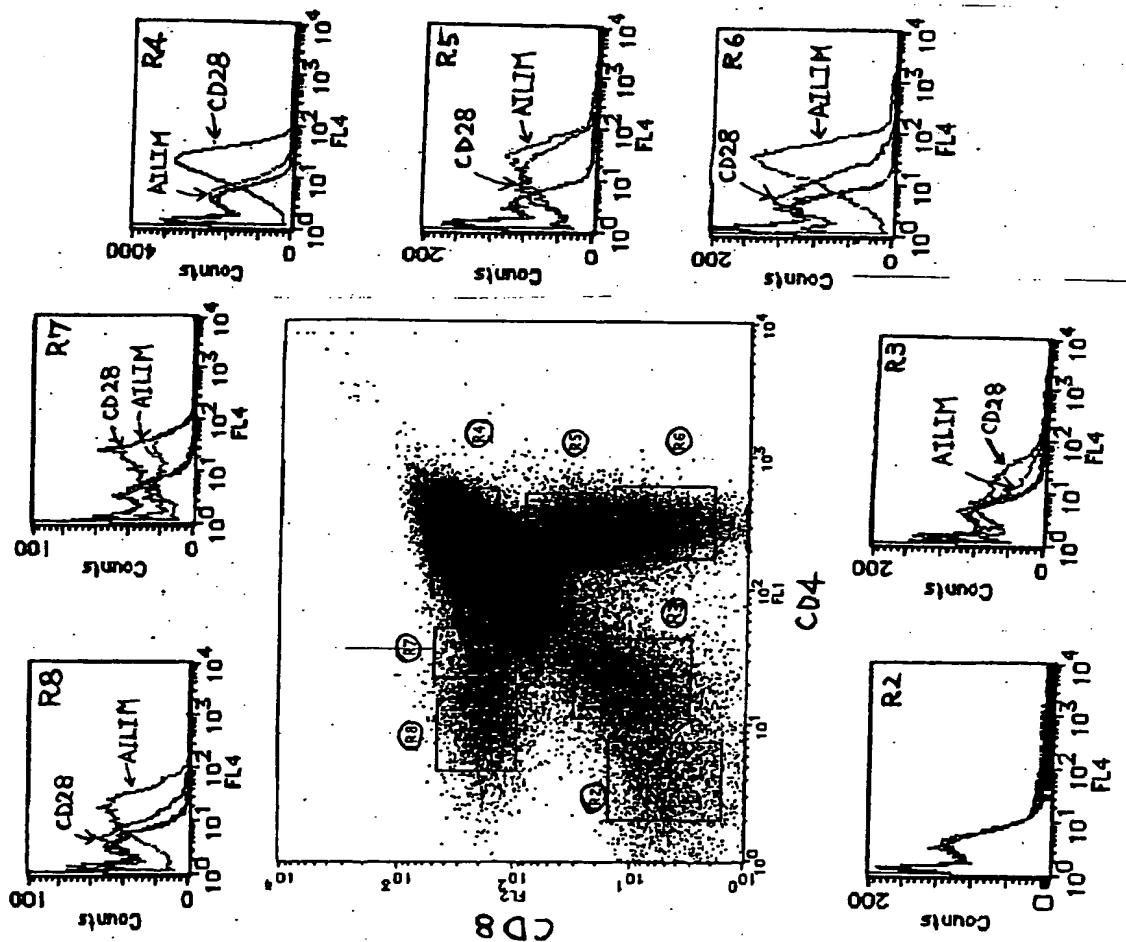
「CTLA4-Ig」：ヒトCTLA4-IgFcキメラ分子。

【書類名】 図面

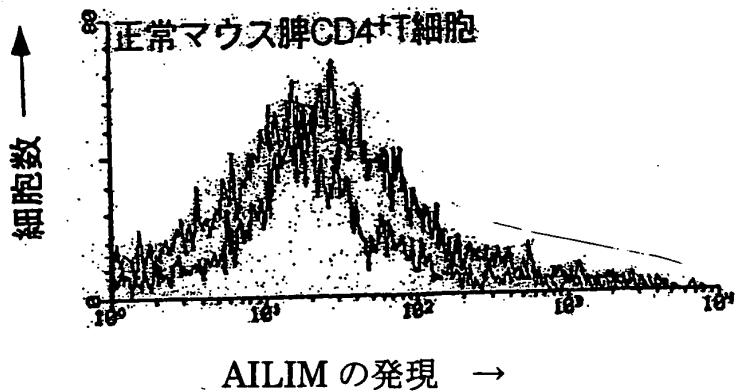
【図1】



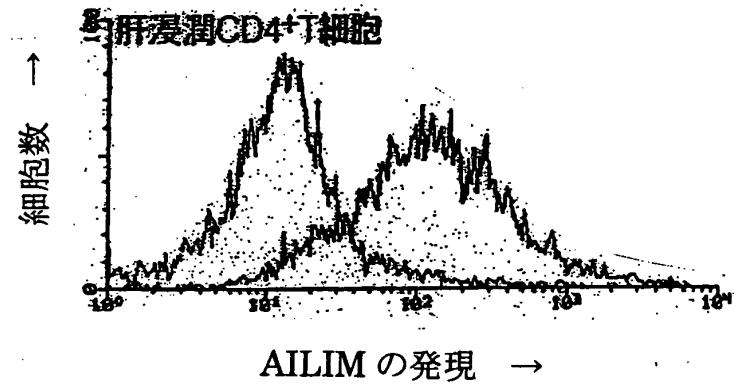
【図2】



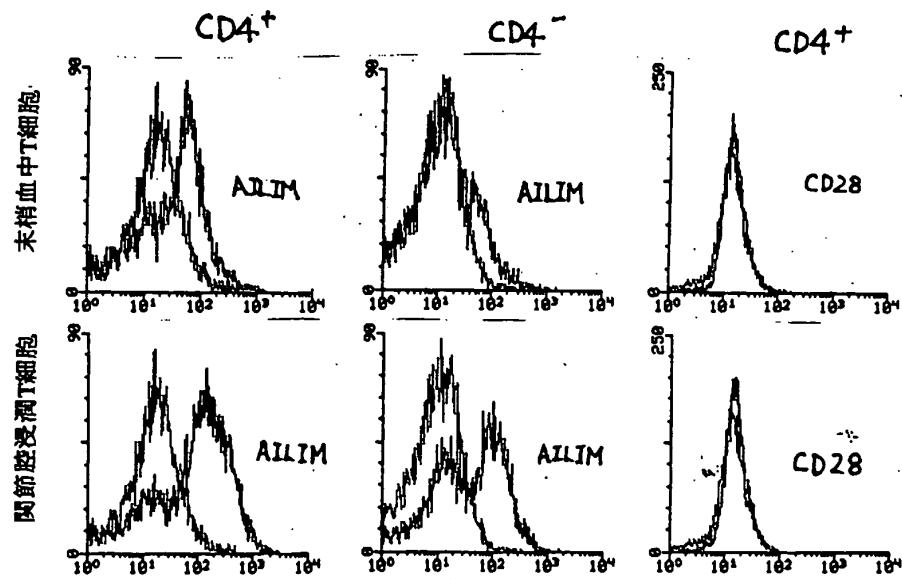
【図3】



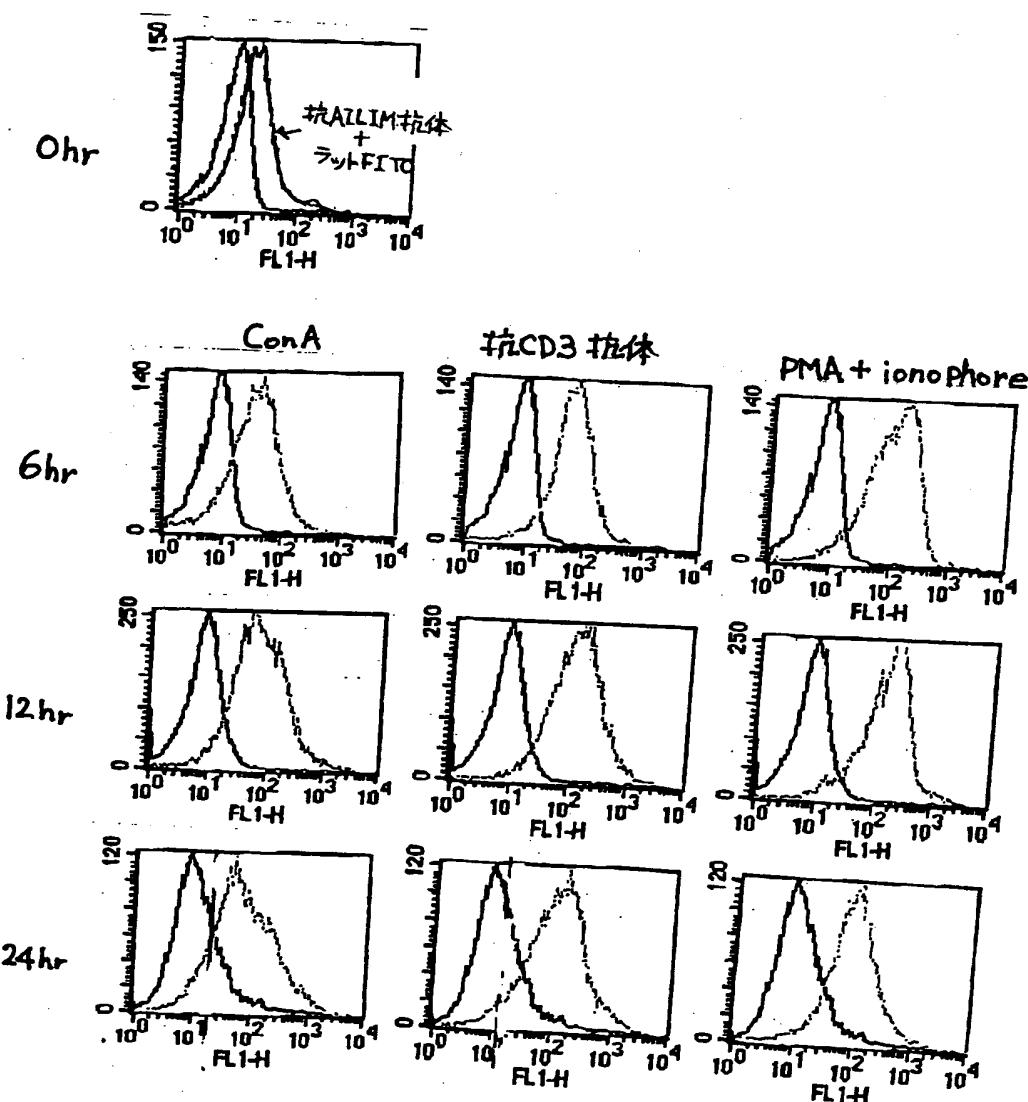
【図4】



【図5】



【図6】

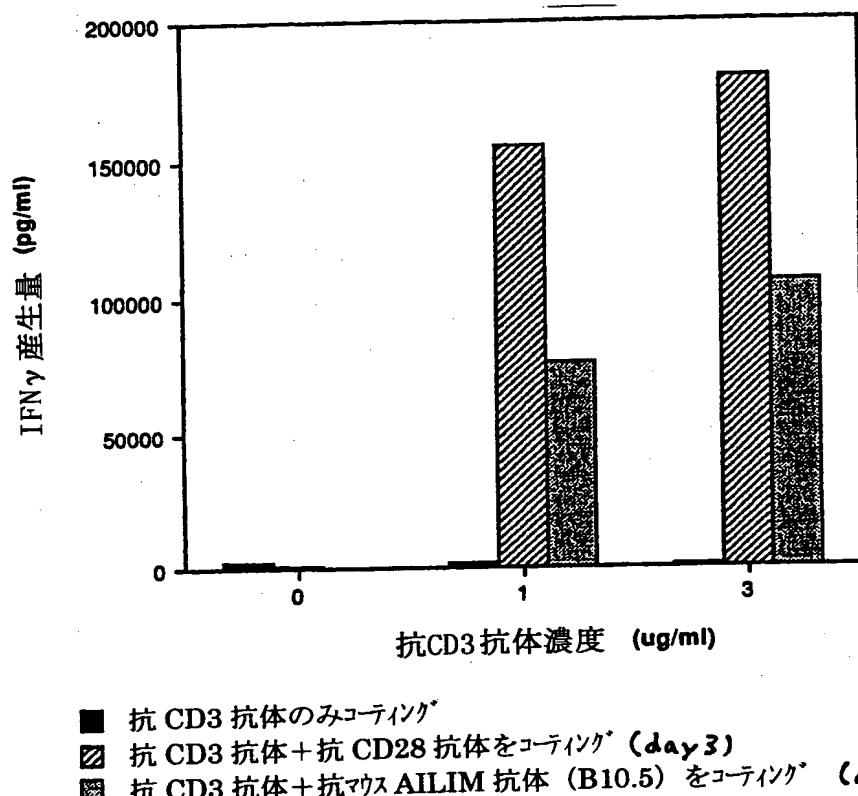


【図7】

## 各種T細胞株のAILIM(マウス)の発現パターン

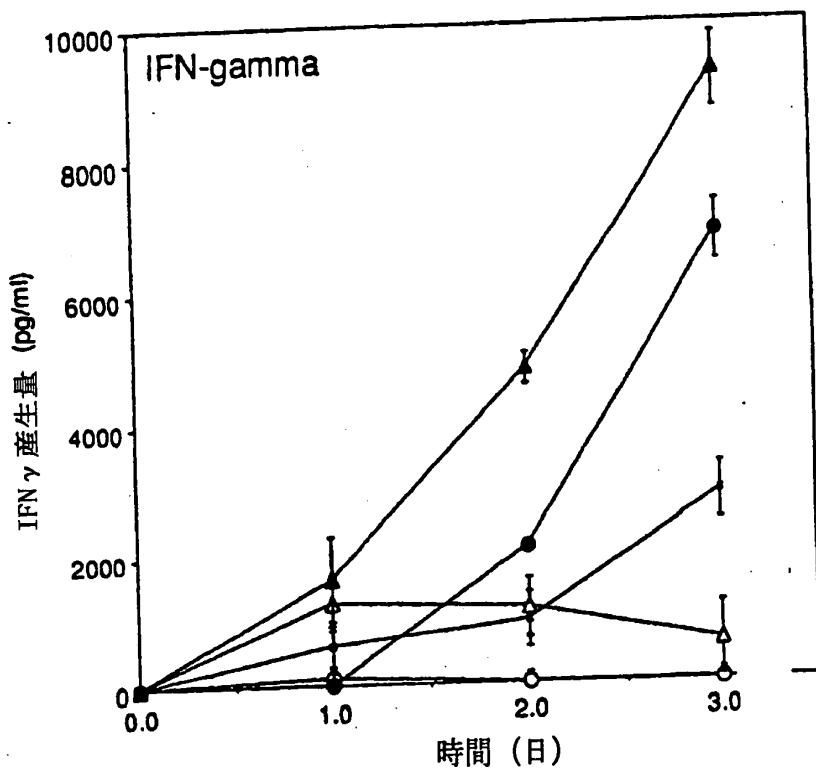
| line                     | specificity      | Lymphokine         | Th1/Th2 | CD28/AIIM |
|--------------------------|------------------|--------------------|---------|-----------|
| 1.T細胞株                   |                  |                    |         |           |
| D10                      | Con-Albumin      | IL-4               | Th2     | +/-       |
| <u>MS202</u>             | I-A <sup>b</sup> | IL-4               | Th2     | +/-       |
| <u>CD28KO</u>            | I-E <sup>b</sup> | IL-4               | Th2     | -/+       |
| <u>EL-4</u>              | ?                | IL-4/2             | Th0     | +/-       |
| 2L2                      | Cytochrome C     | IL-2/IFN- $\gamma$ | Th1     | +/-       |
| BC3C13                   | Mis <sup>a</sup> | IFN- $\gamma$      | Th1     | +/-       |
| 2.Tハイブリドーマ<br>(BW5147親株) |                  |                    |         |           |
| KV24                     | ?                | IL-2               | Th1     | +/-       |
| DO.11.10                 | OVA              | IL-2               | Th1     | +/-       |
| 8-4-31                   | SEB              | IL-2               | Th1     | +/-       |
| 3H10-11                  | SEB              | IL-2               | Th1     | +/-       |
| 61-21-25                 | SEB              | IL-2               | Th1     | +/-       |
| 1-2-66                   | SEB              | IL-2               | Th1     | +/-       |
| 6-13-64                  | SEB              | IL-2               | Th1     | -/-       |

【図8】



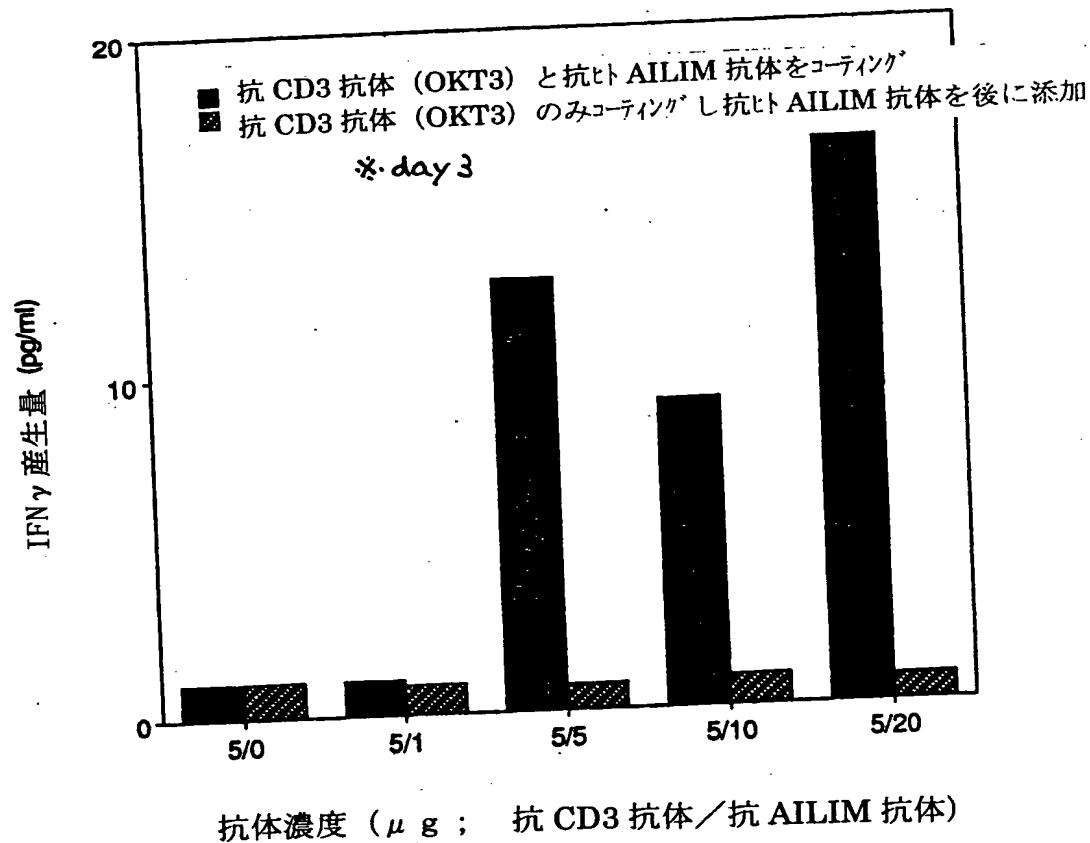
- 抗 CD3 抗体のみコーティング\*
- ▨ 抗 CD3 抗体+抗 CD28 抗体をコーティング\* (day 3)
- ▨ 抗 CD3 抗体+抗マウス AILIM 抗体 (B10.5) をコーティング\* (day 3)

【図9】

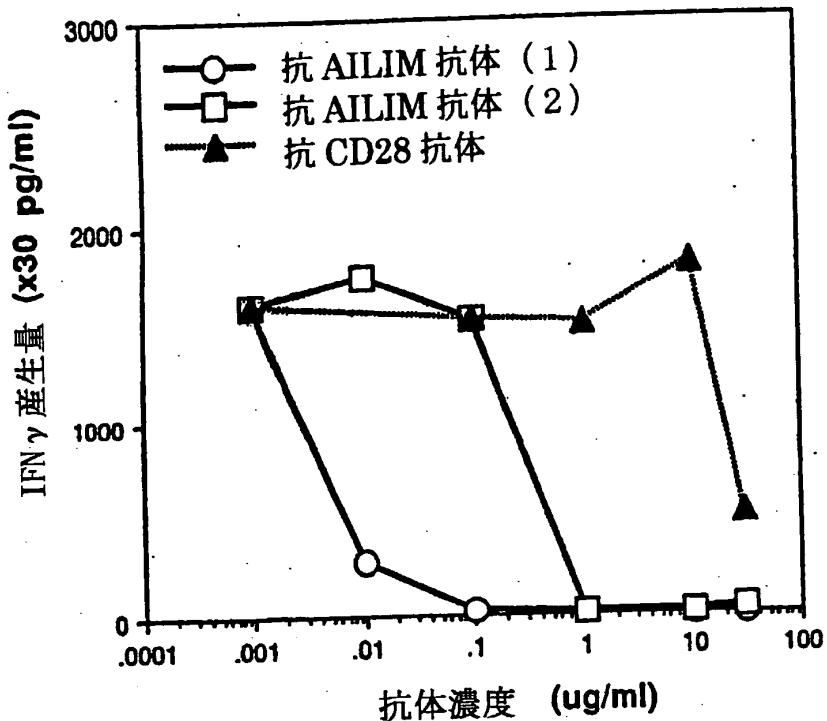


- ▲抗CD3抗体+抗ラットAILIM抗体 (JTT-1抗体)をコーティング
- 抗CD3抗体+抗CD28抗体をコーティング
- ×抗CD3抗体のみコーティング
- △抗ラットAILIM抗体 (JTT-1抗体)のみコーティング
- 抗CD28抗体のみコーティング

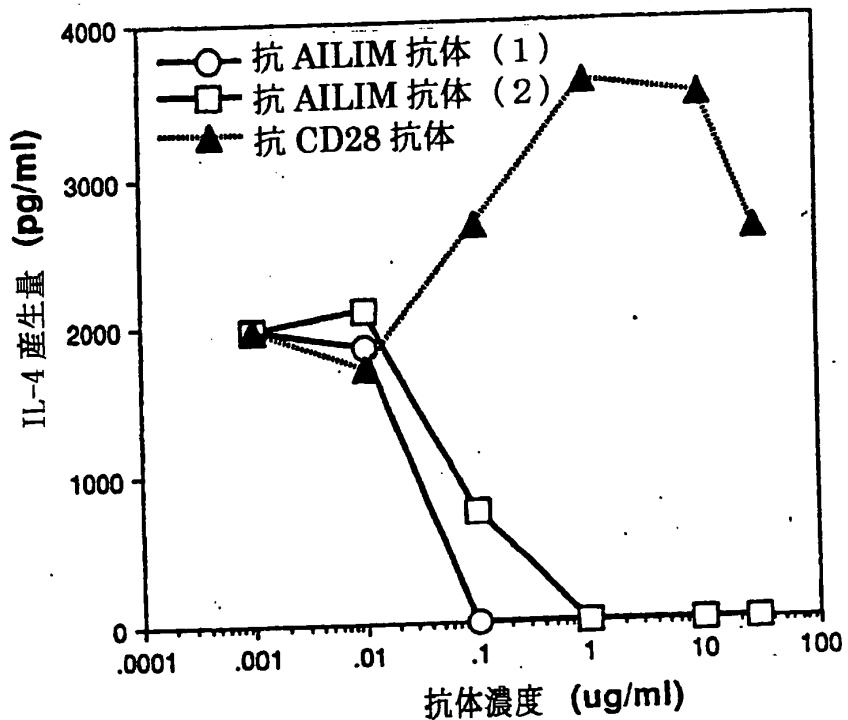
【図10】



【図11】

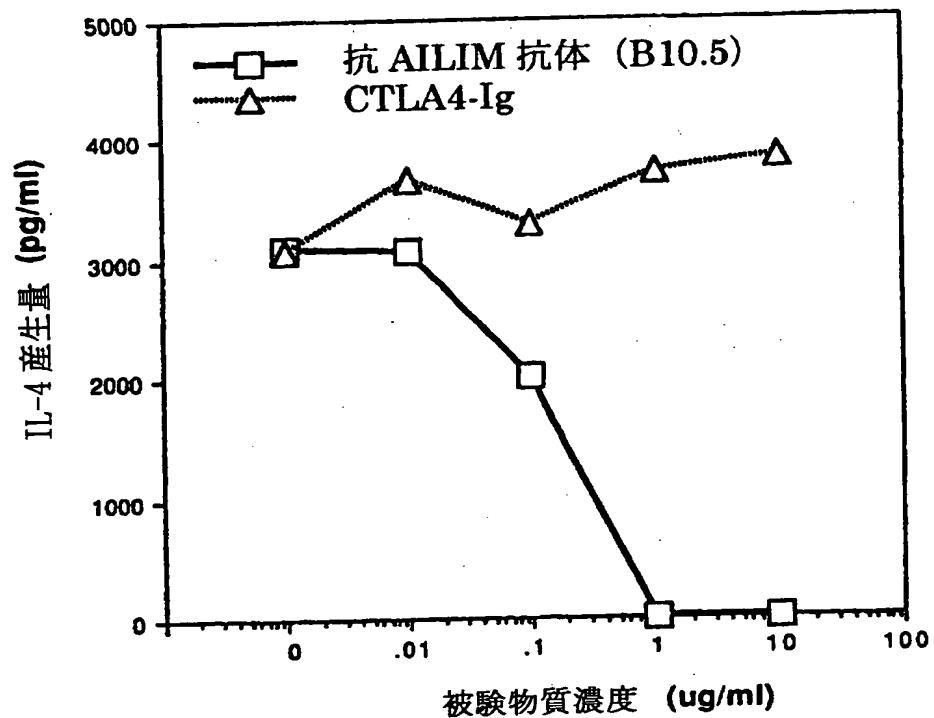


【図12】

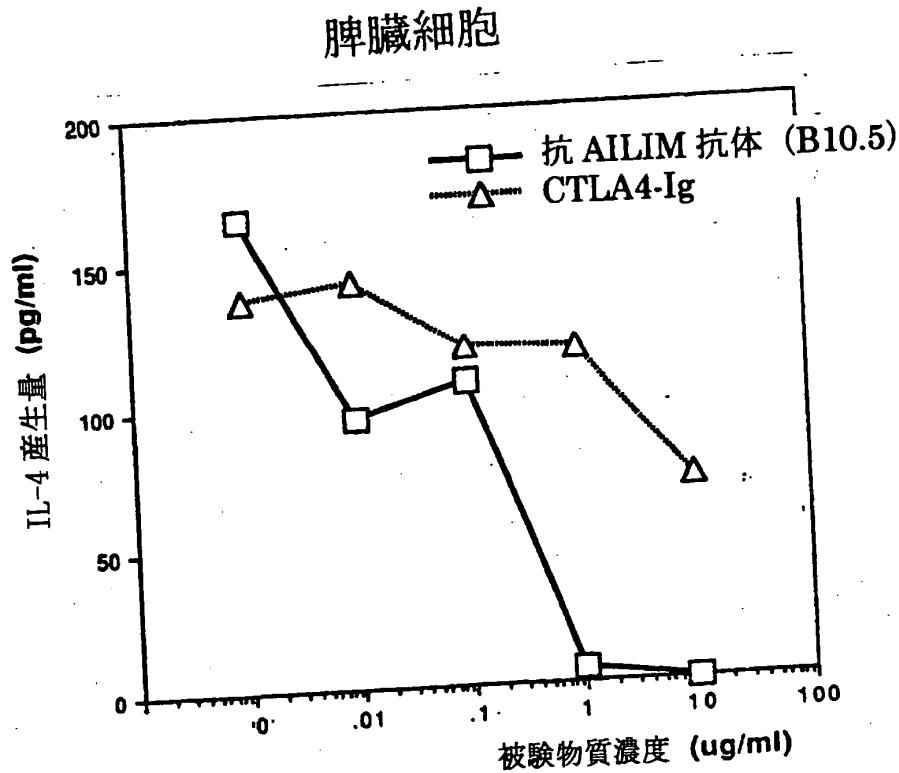


【図13】

## 胸腺細胞

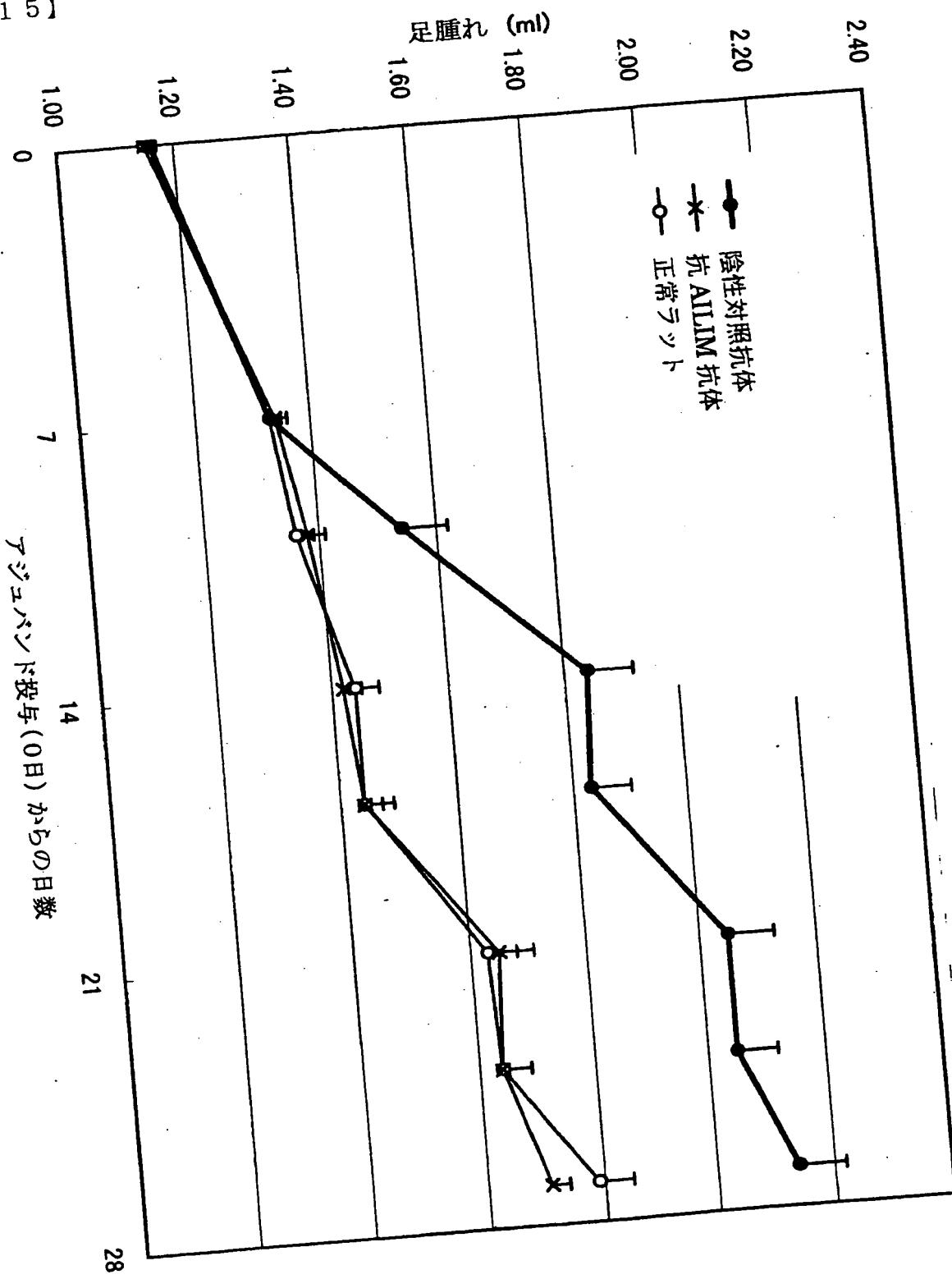


【図14】



特2000-254680

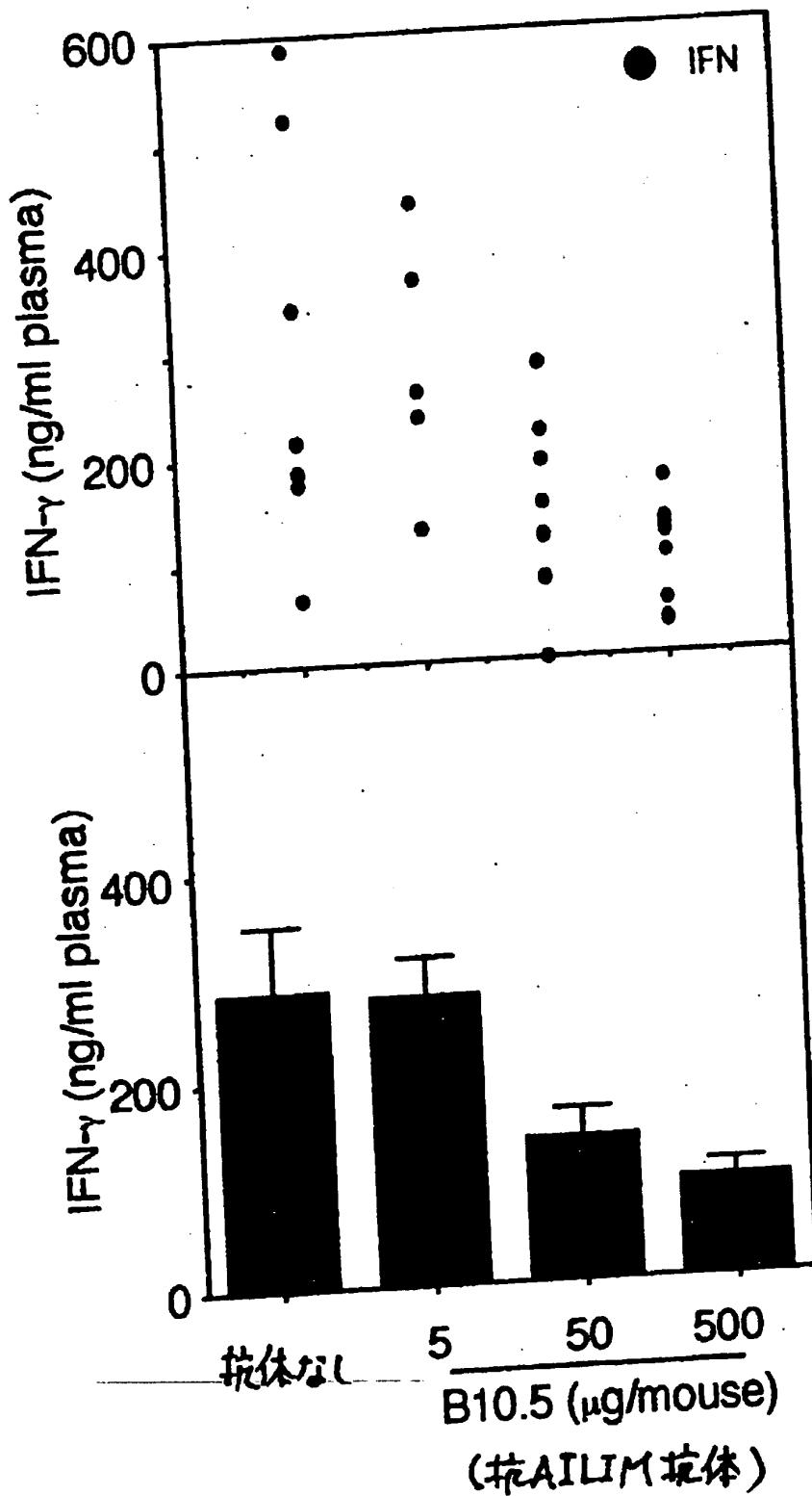
【図15】



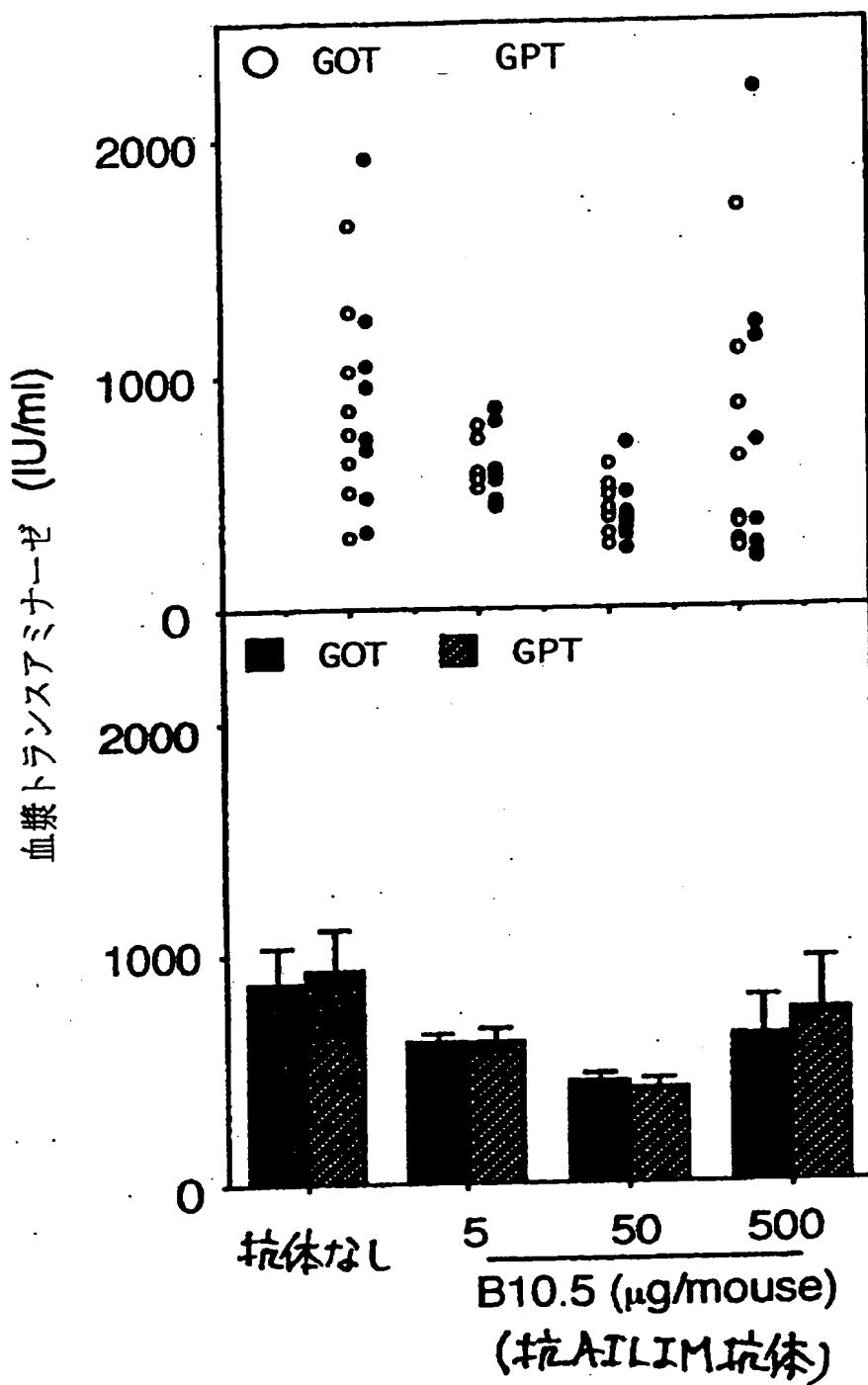
1 1

出証特2000-3090

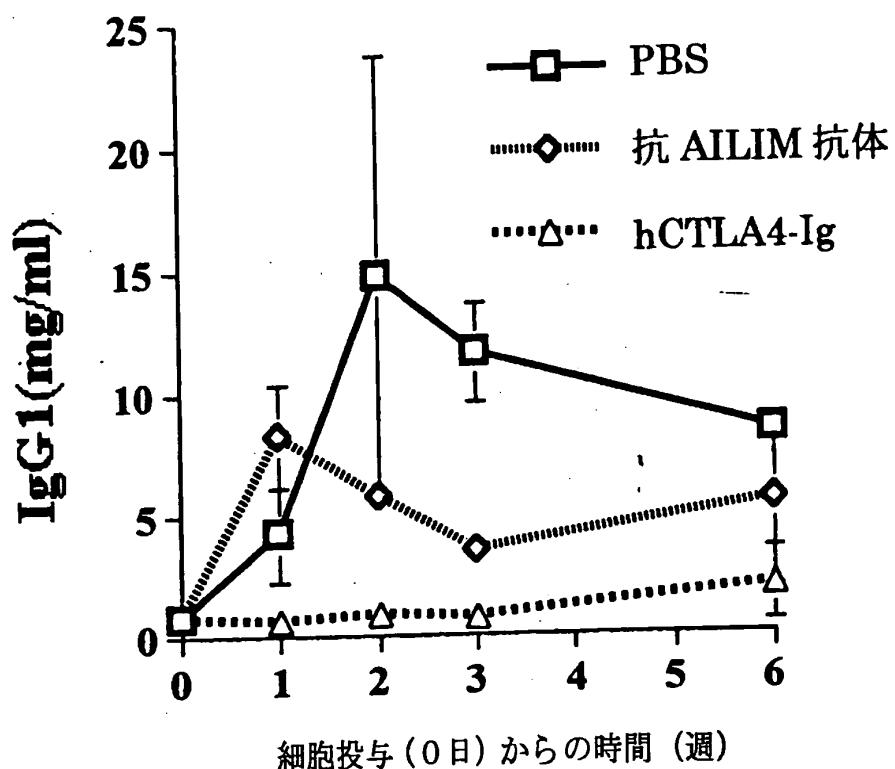
【図16】



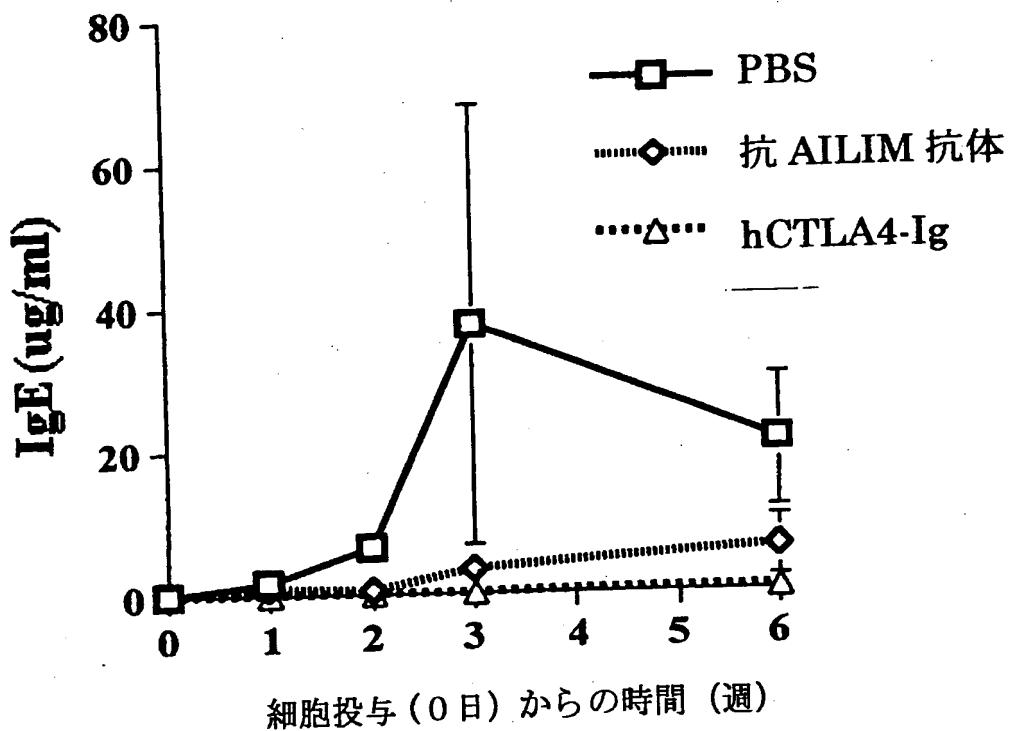
【図17】



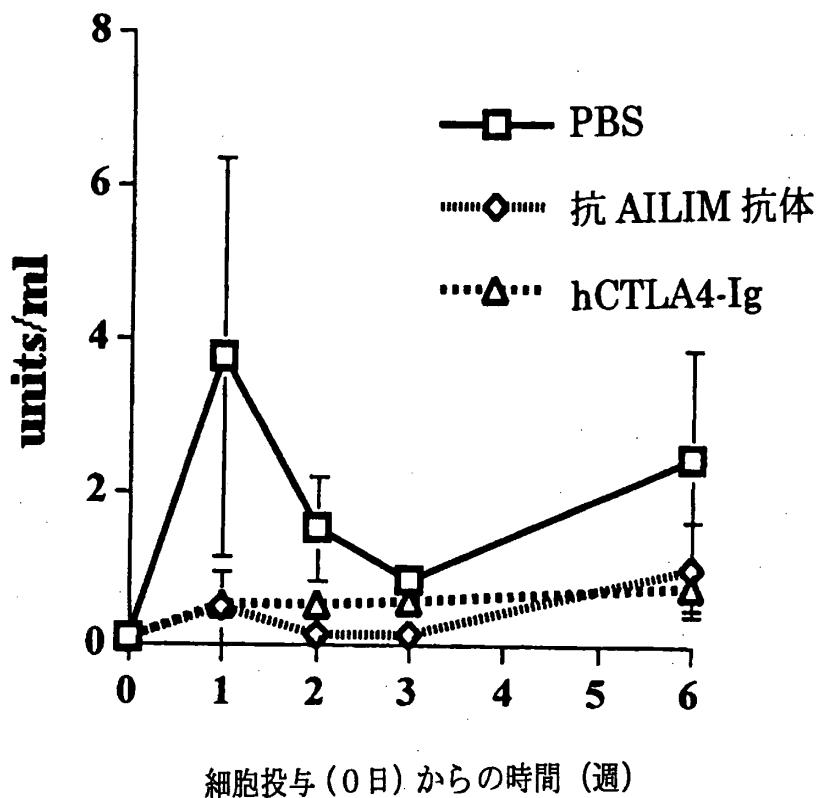
【図18】



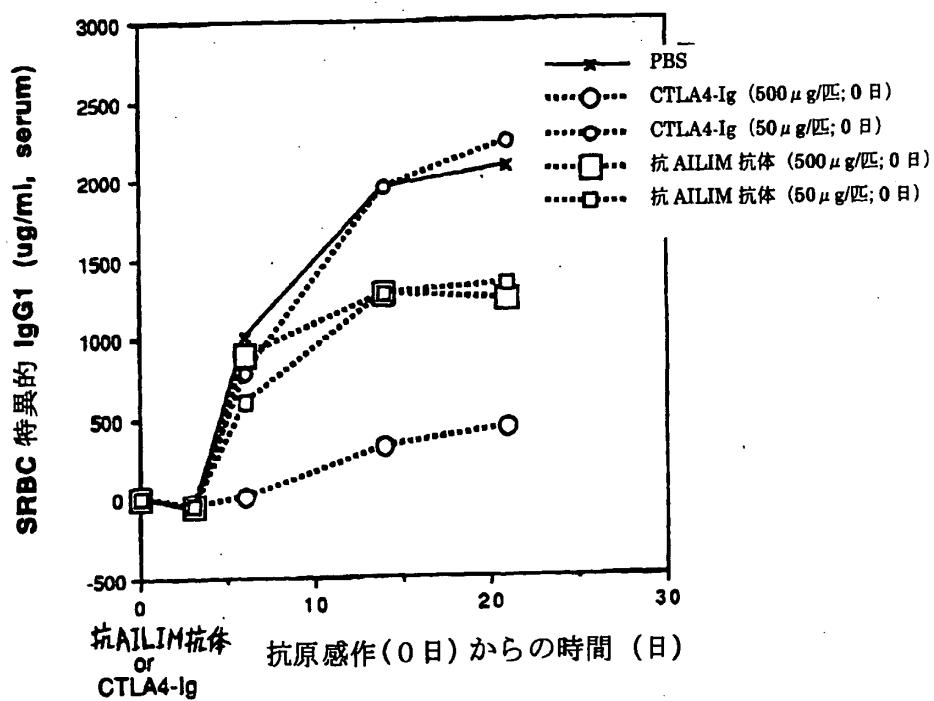
【図19】



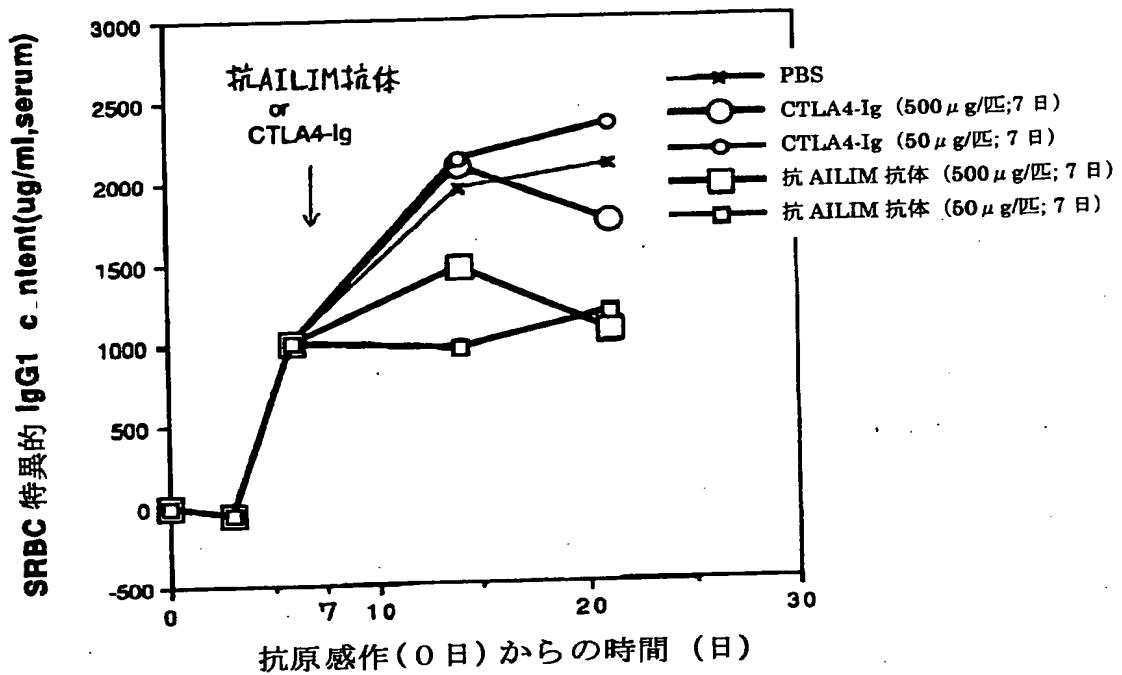
【図20】



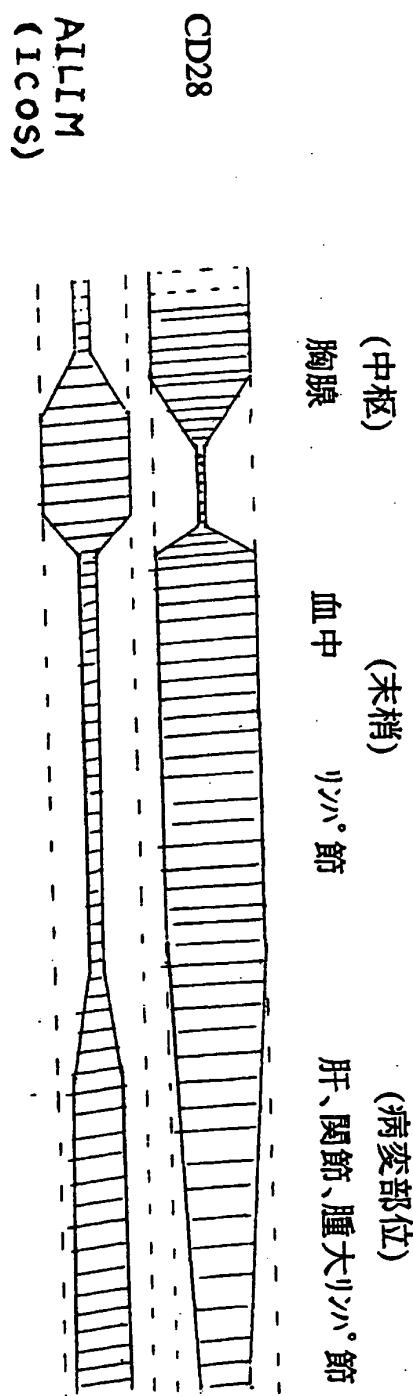
【図21】



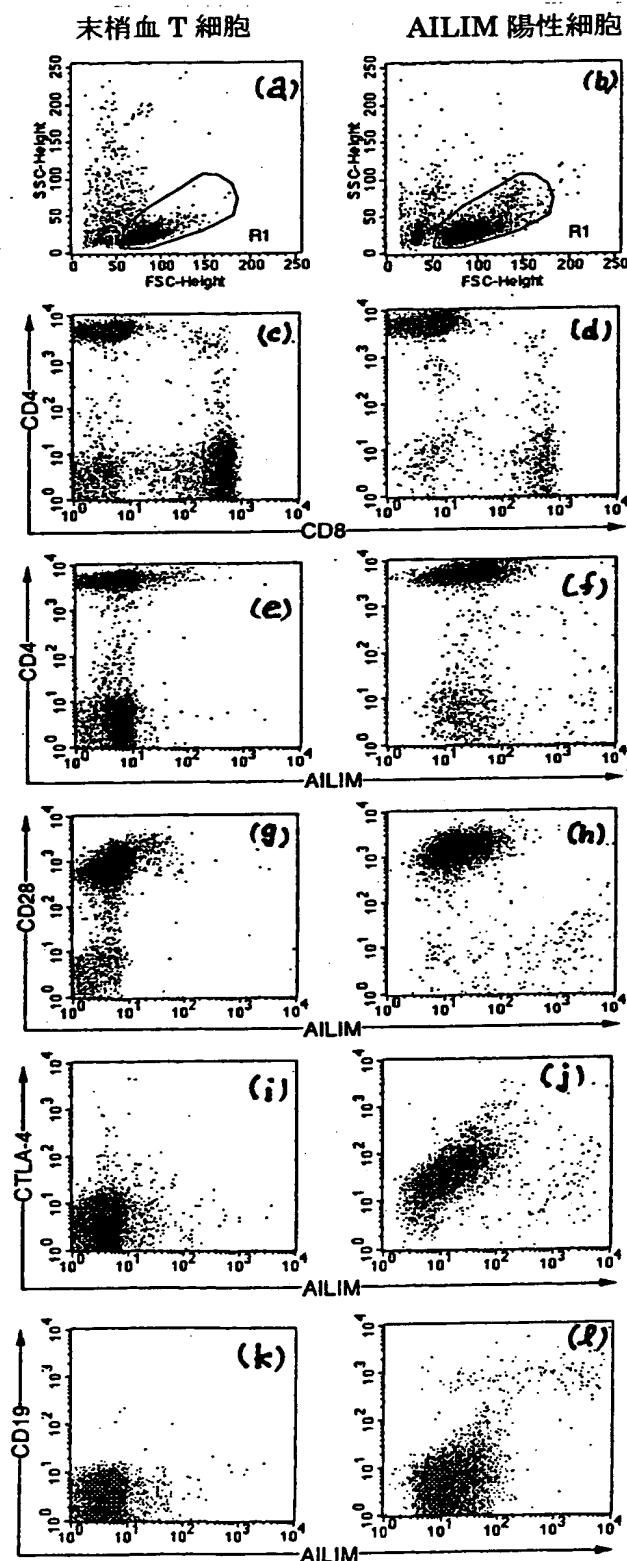
【図22】



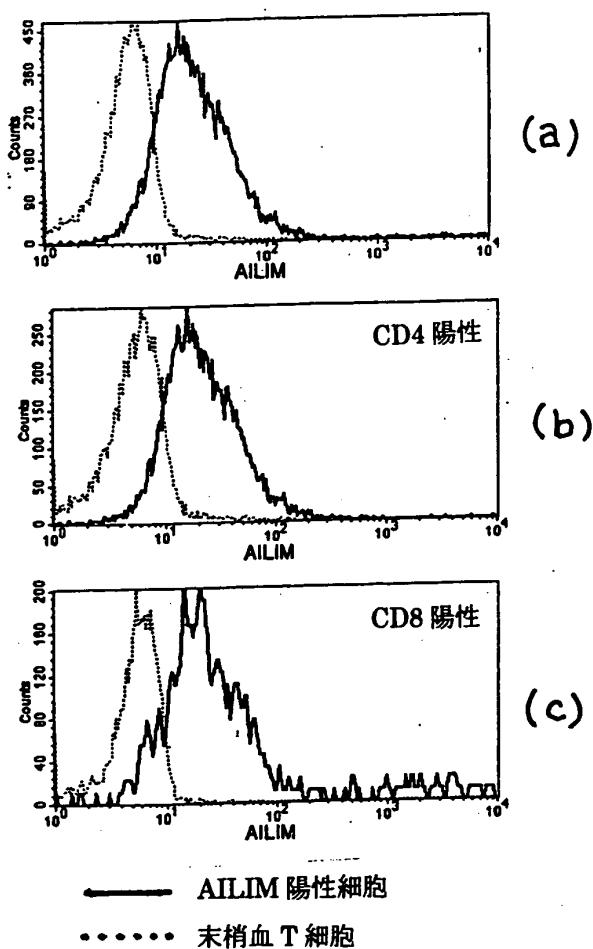
【図23】



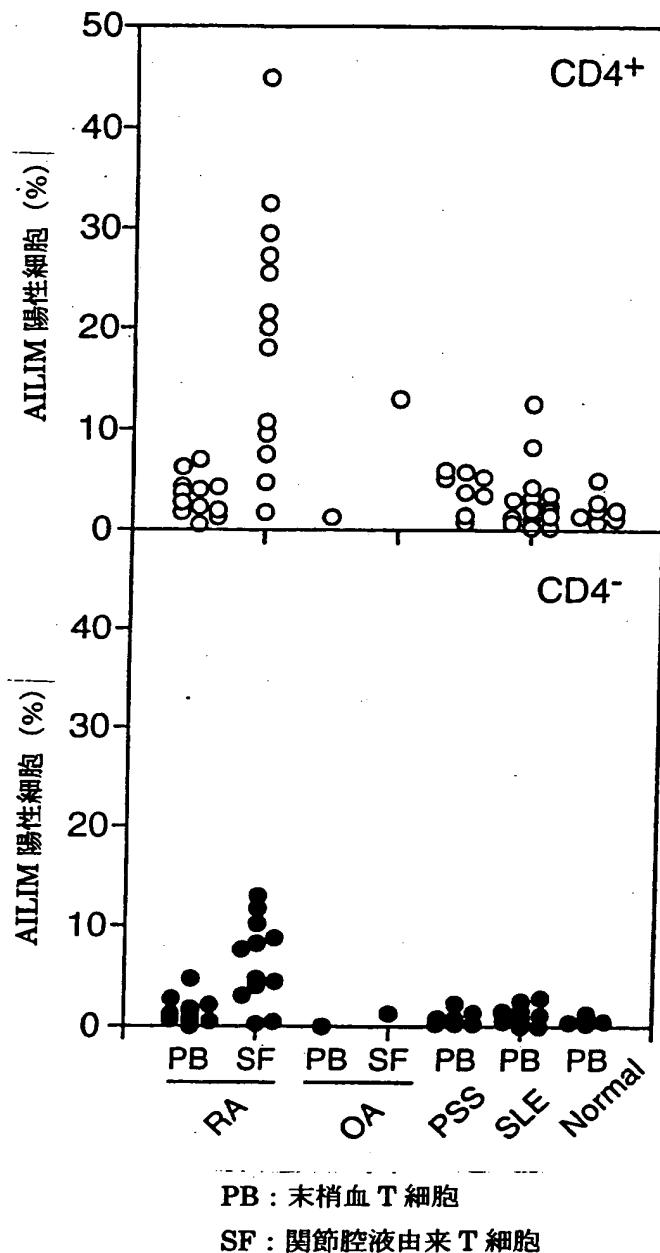
【図24】



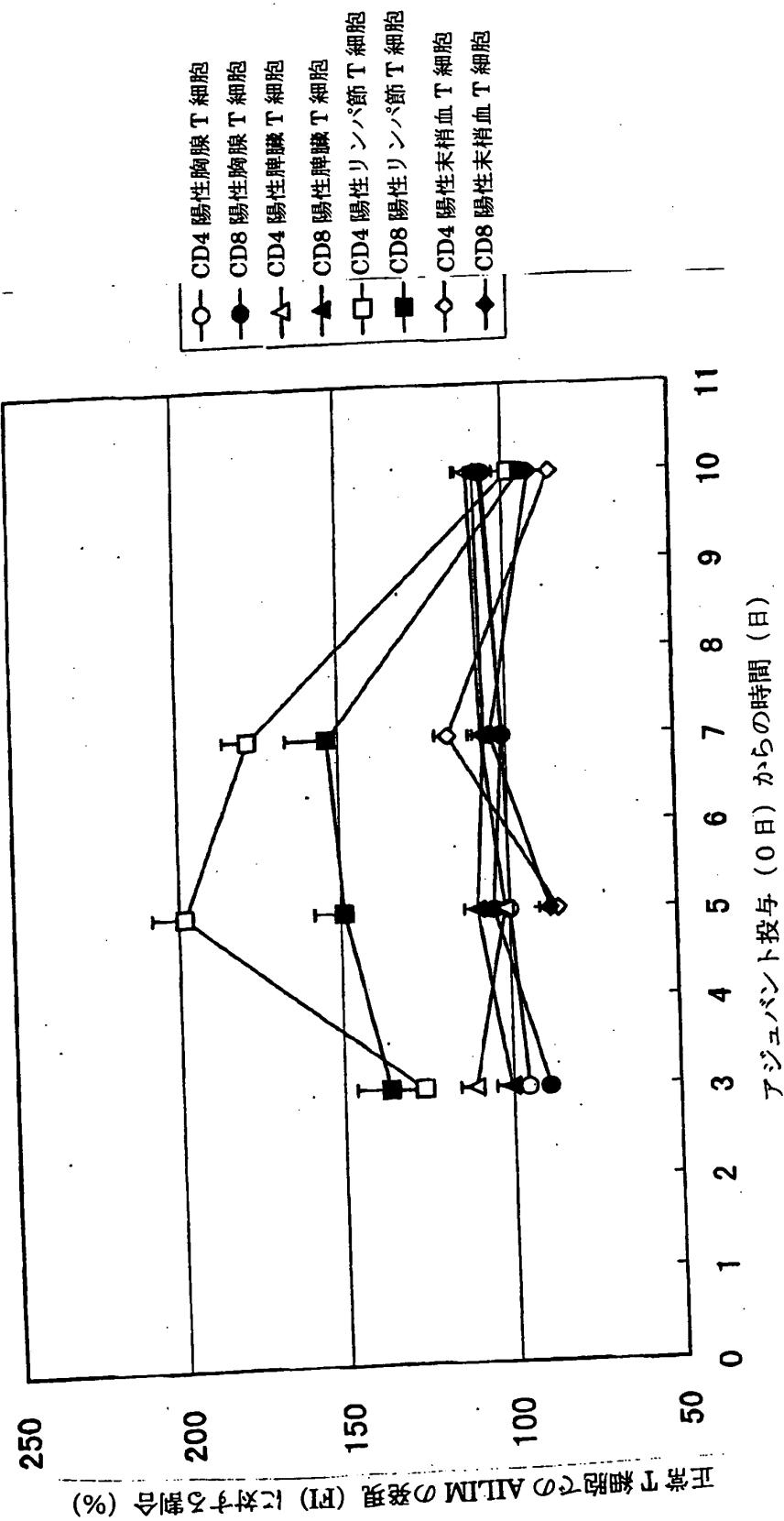
【図25】



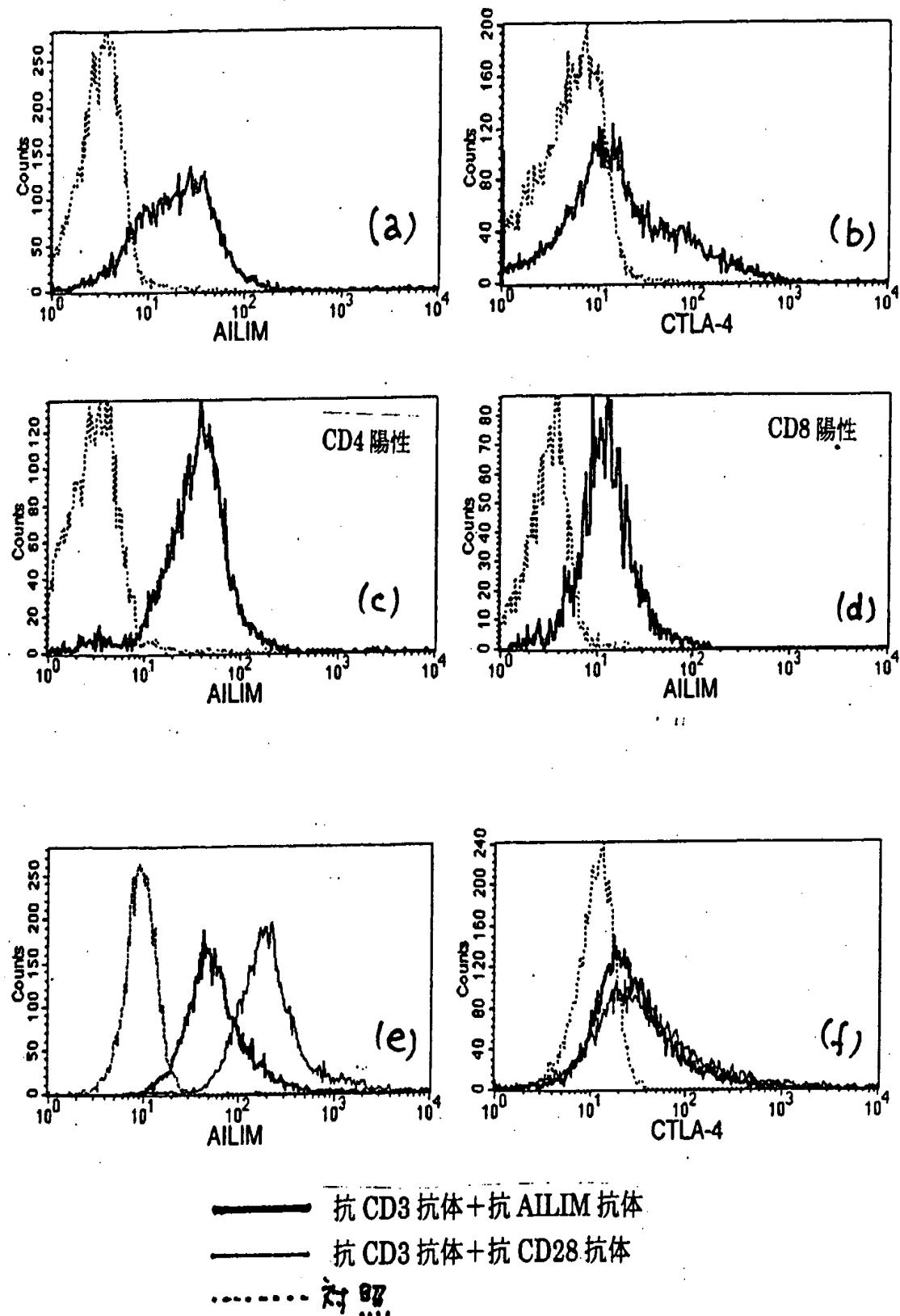
【図26】



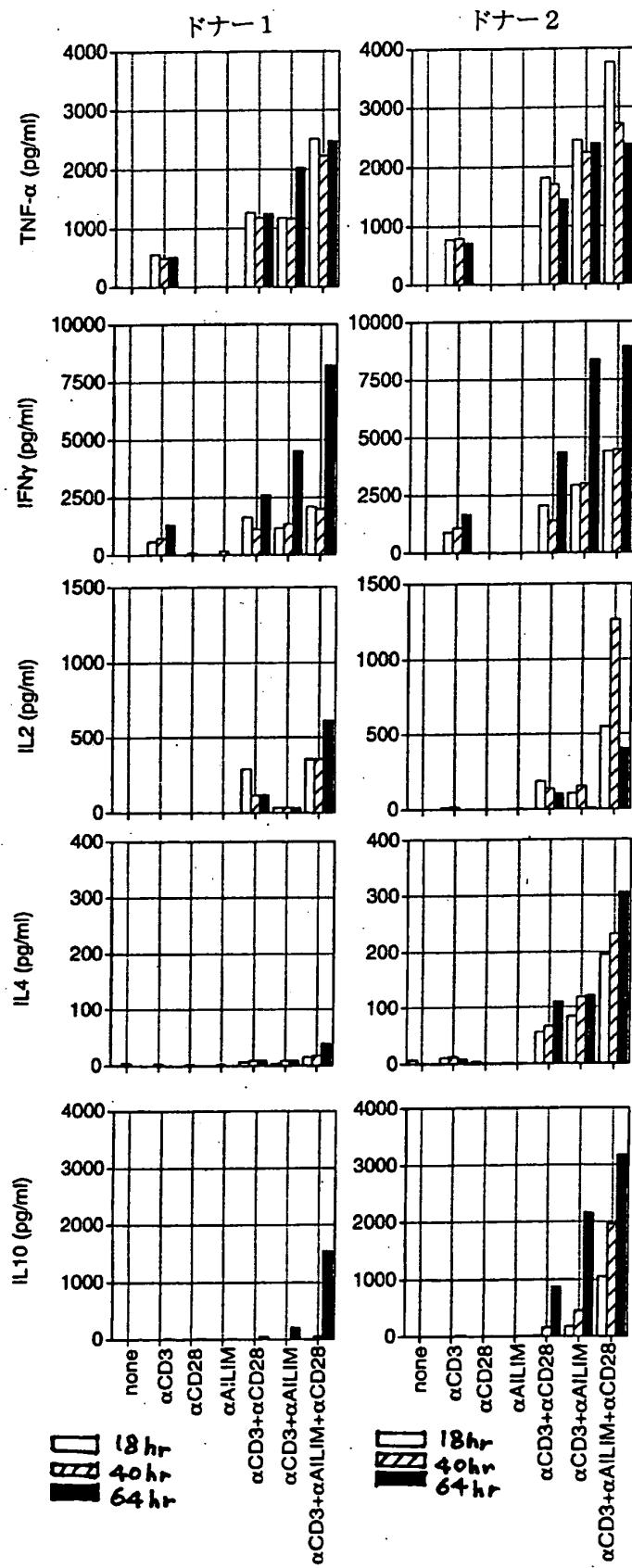
【図27】



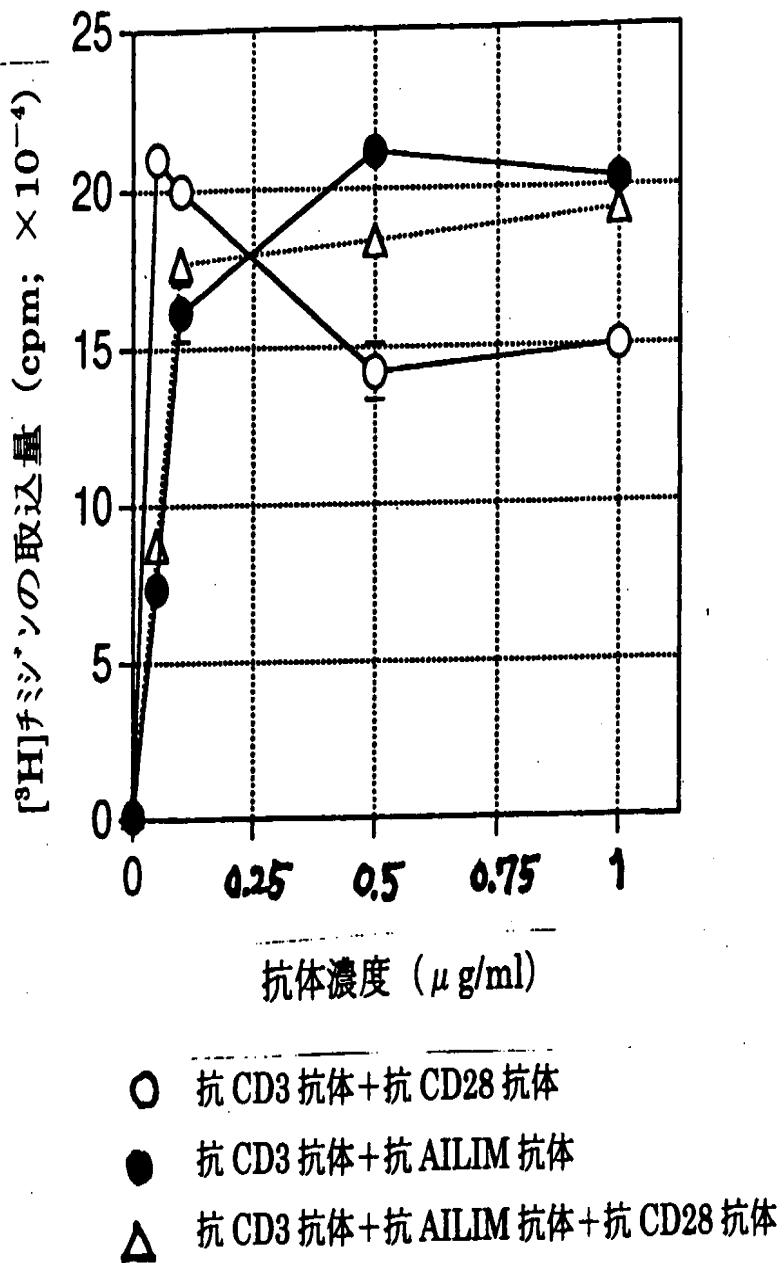
[図28]



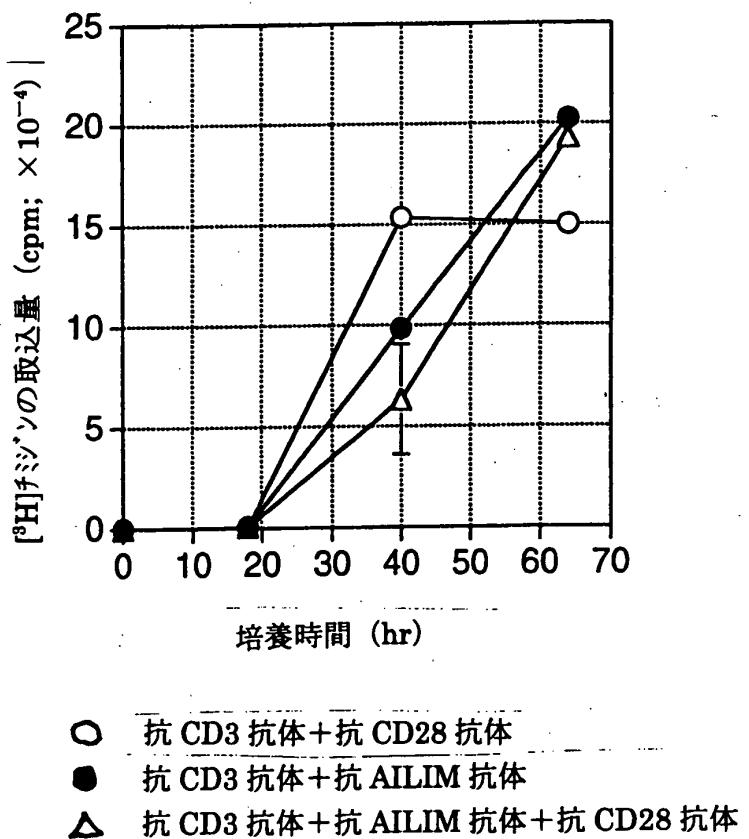
[図29]



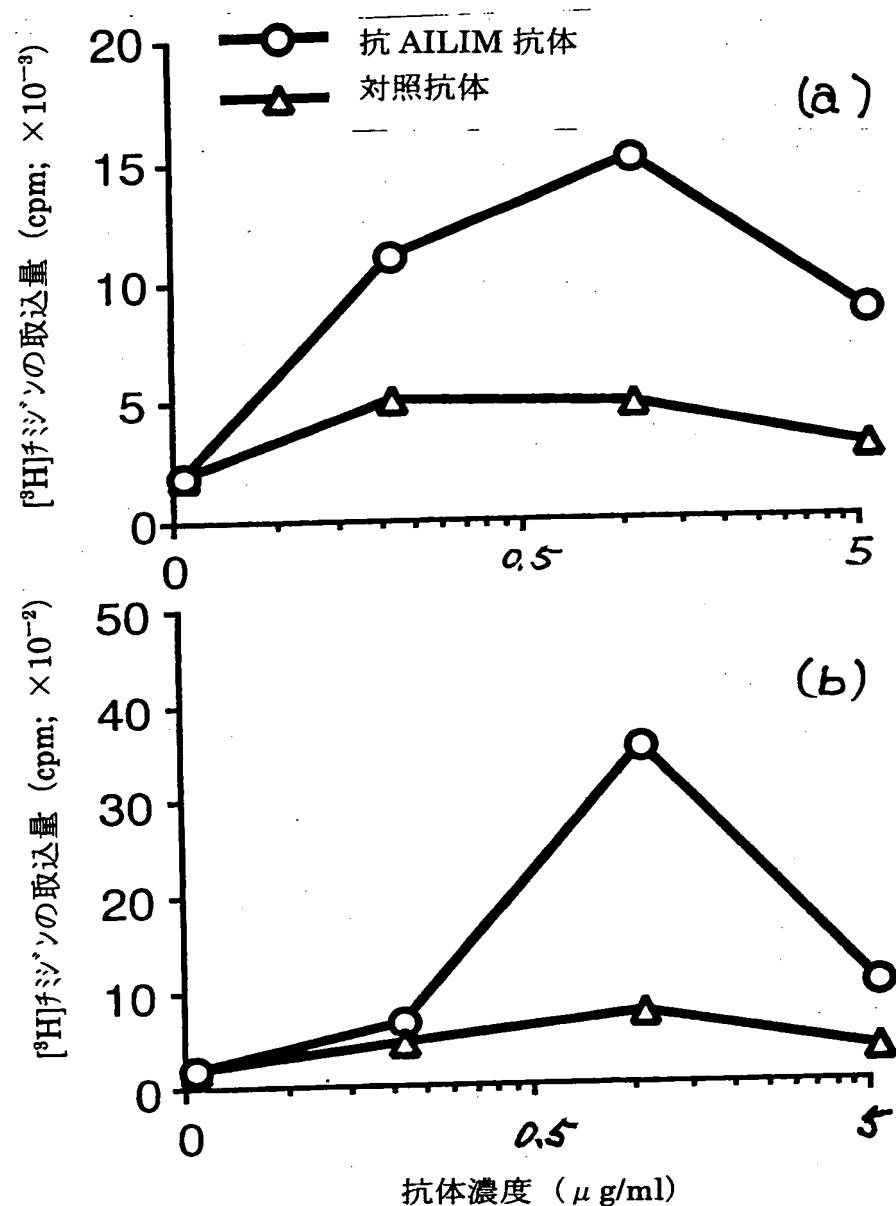
【図30】



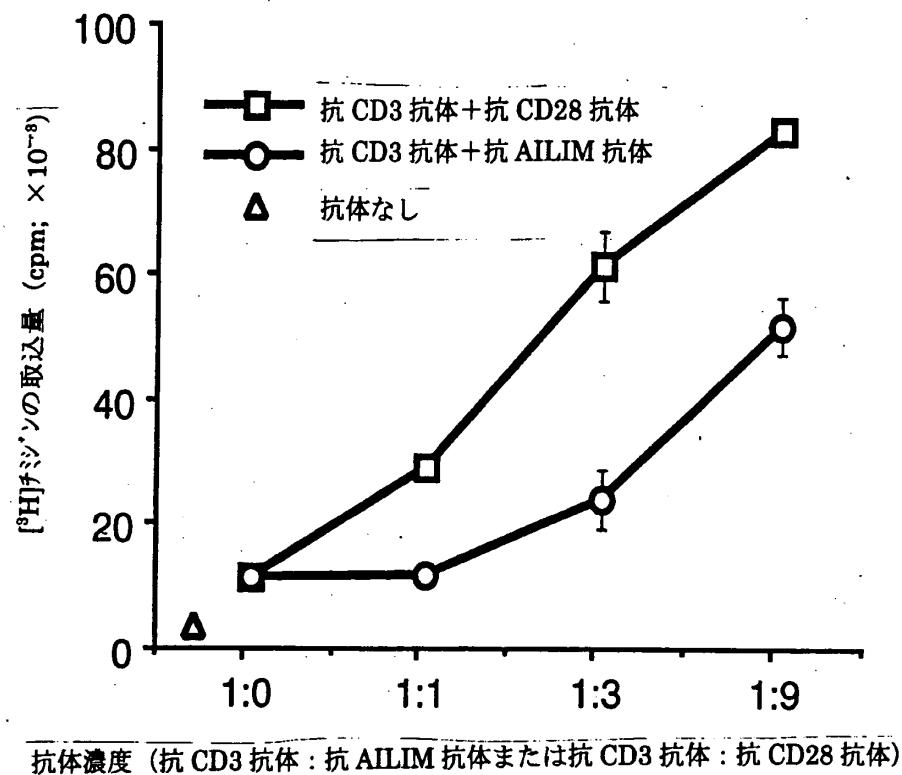
【図31】



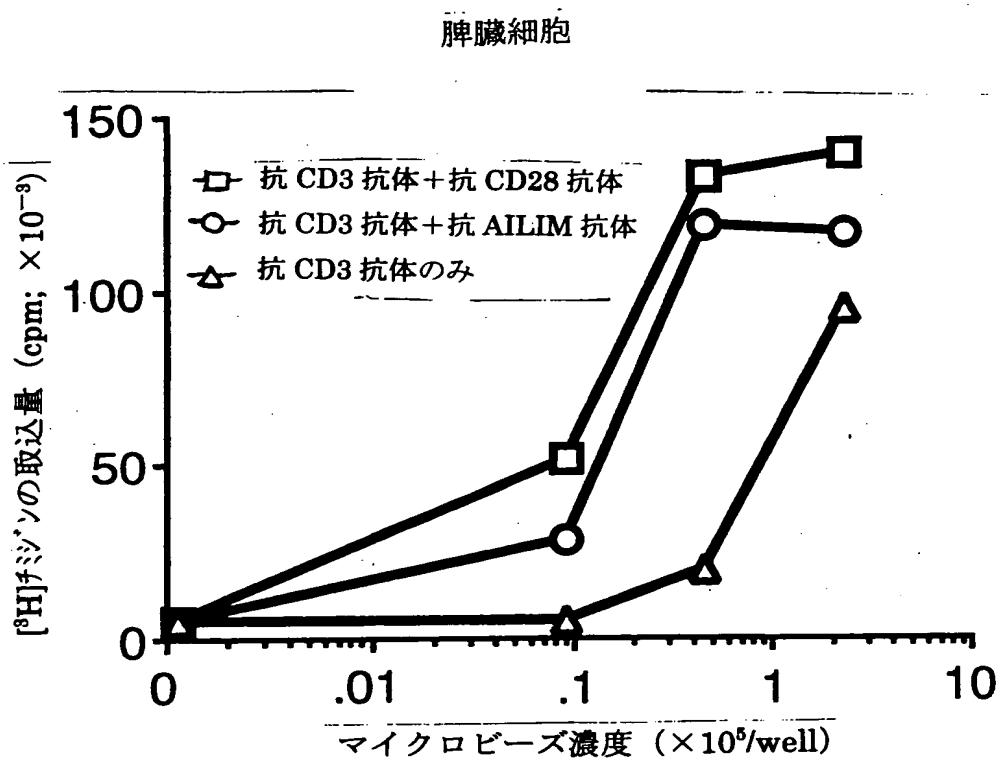
【図32】



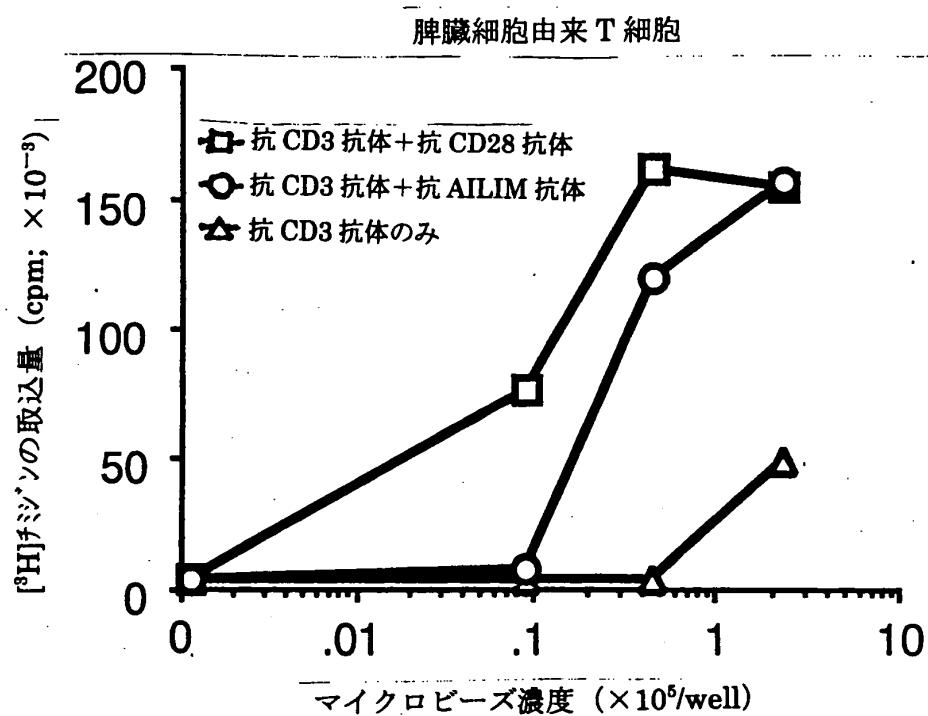
【図33】



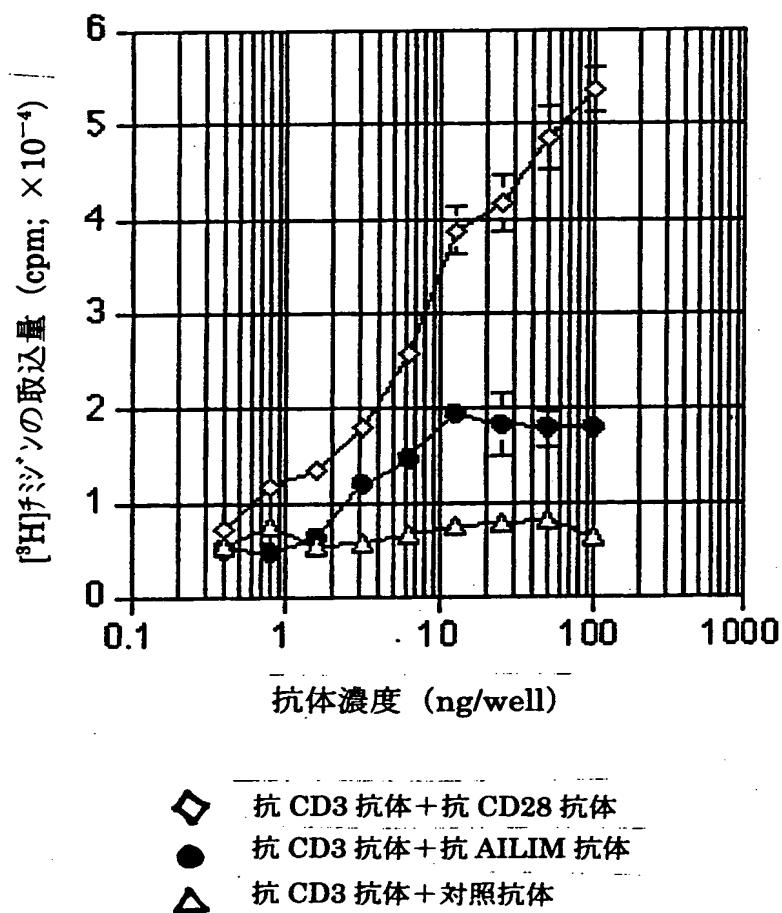
【図34】



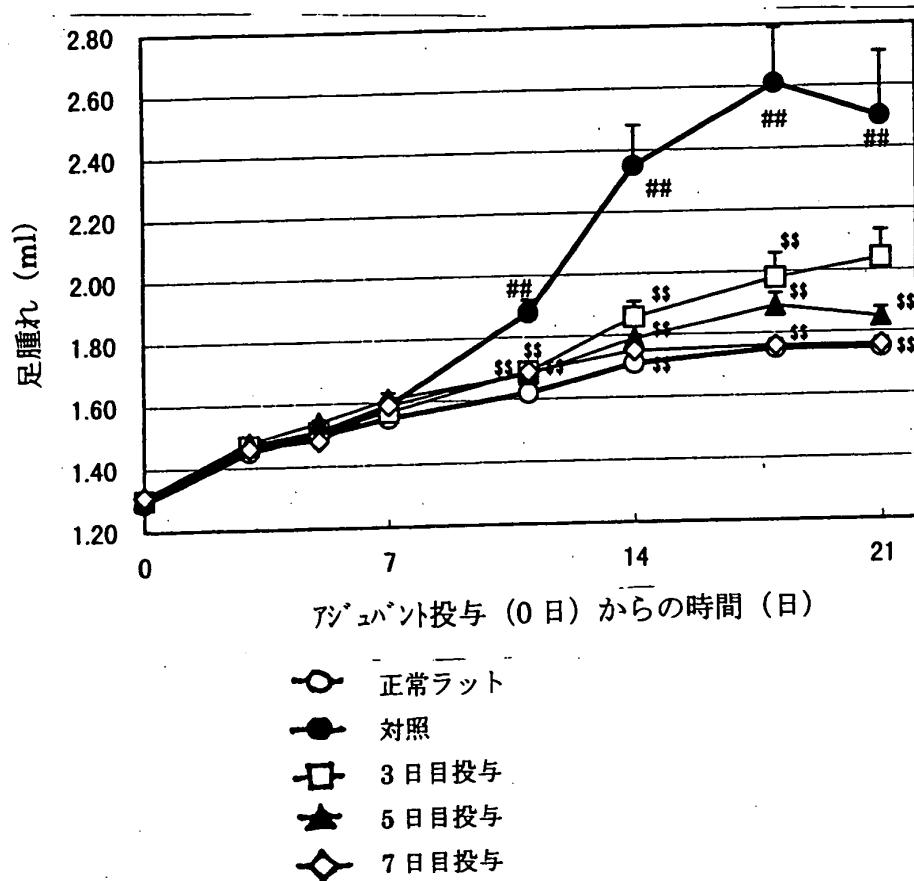
【図35】



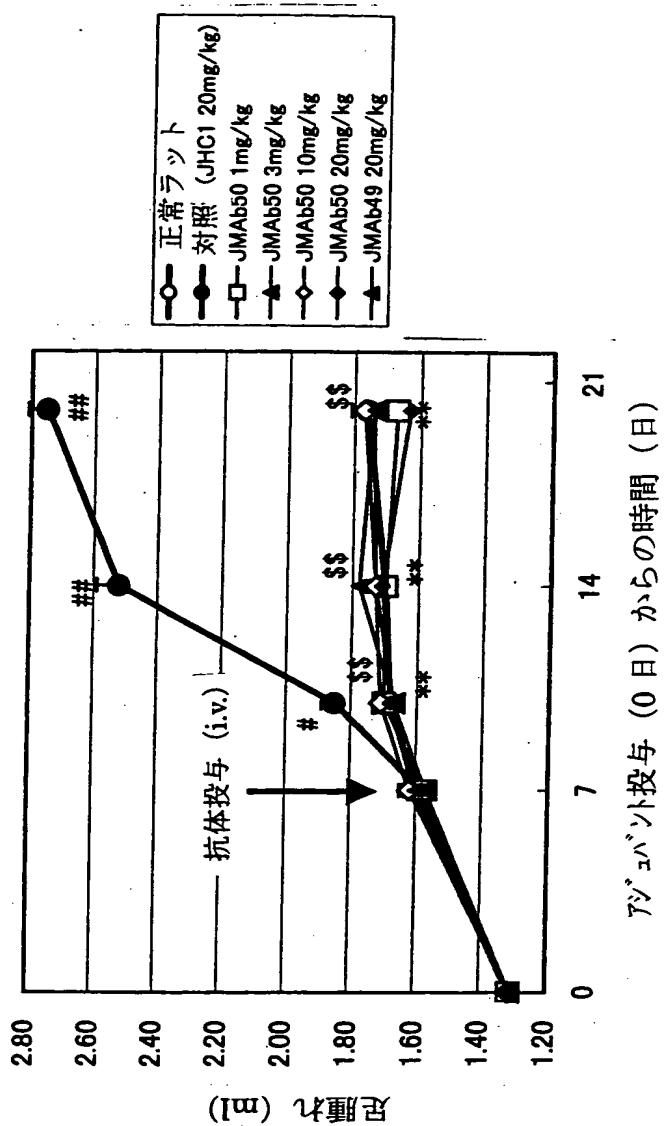
【図36】



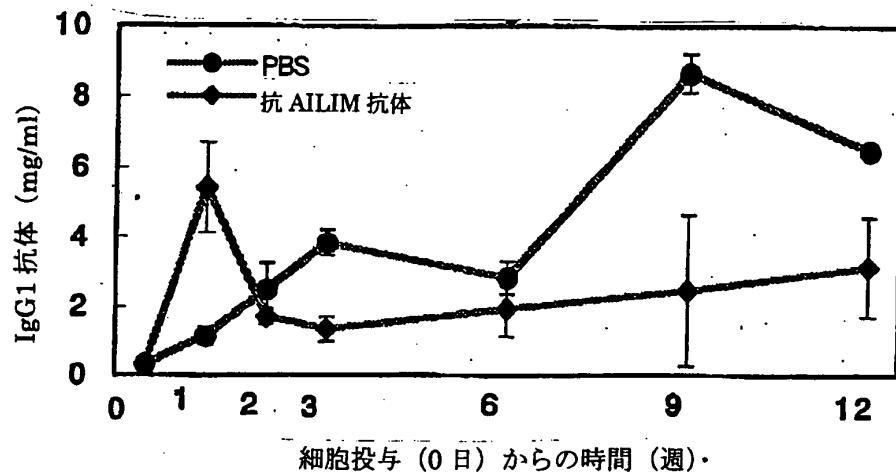
【図37】



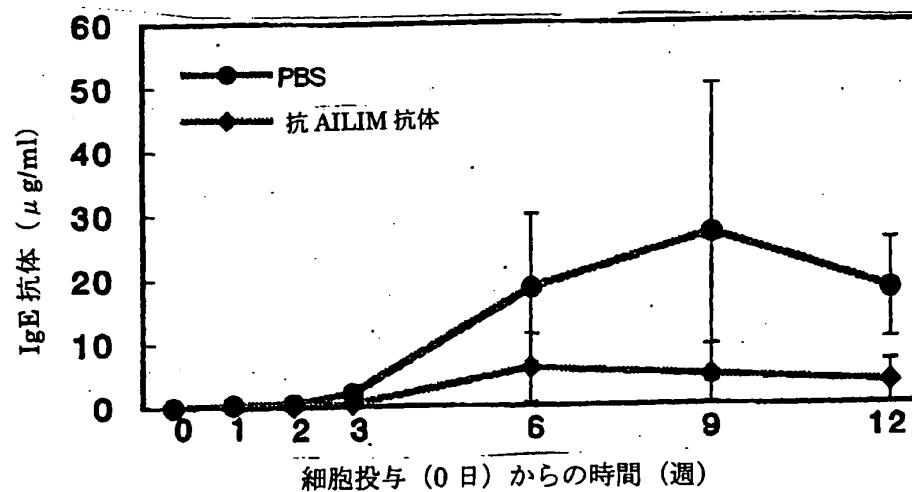
【図38】



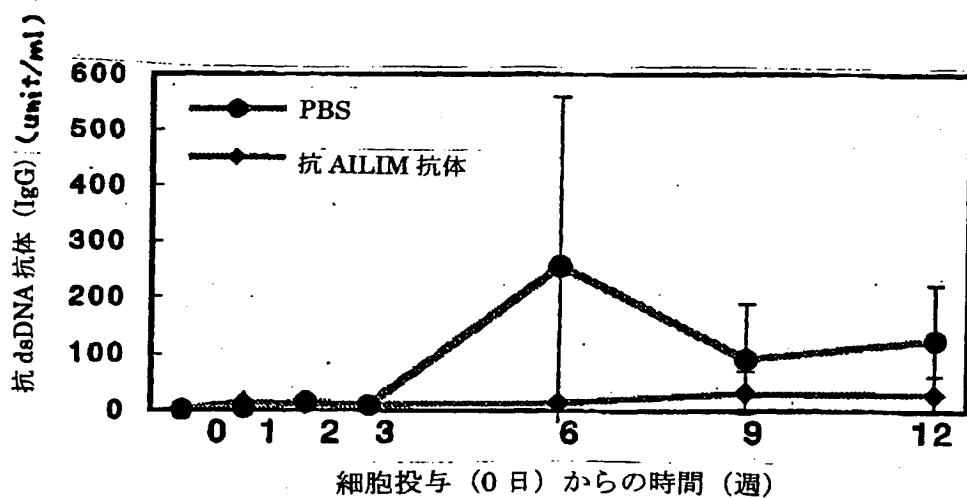
【図39】



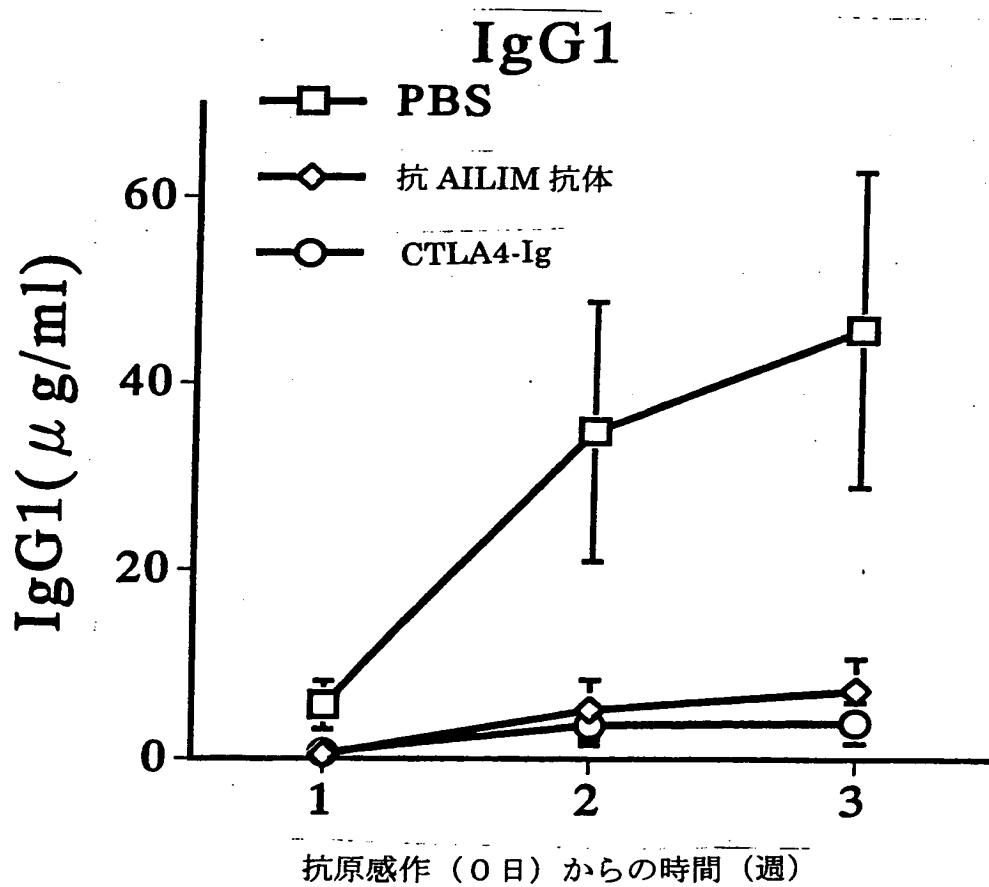
【図40】



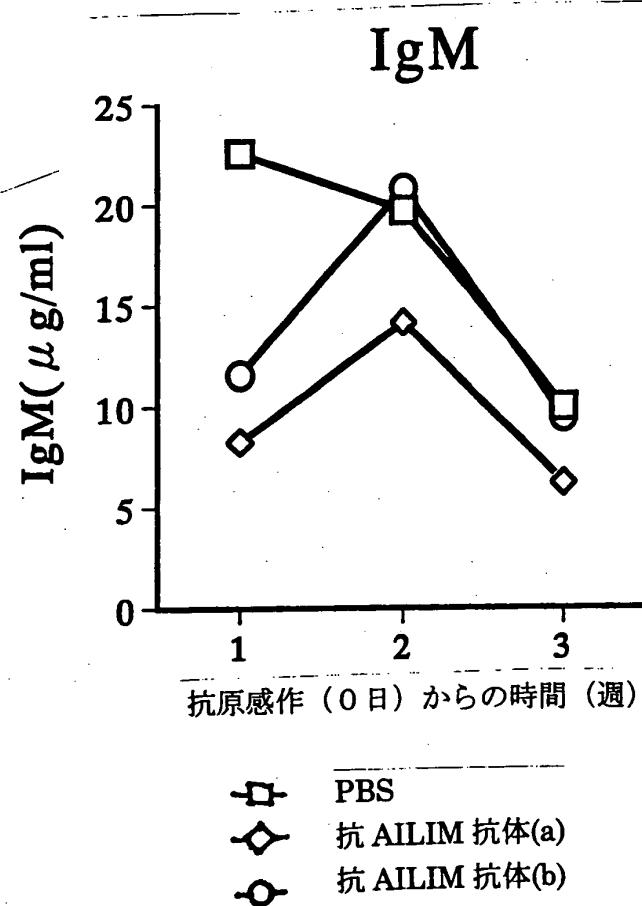
【図4 1】



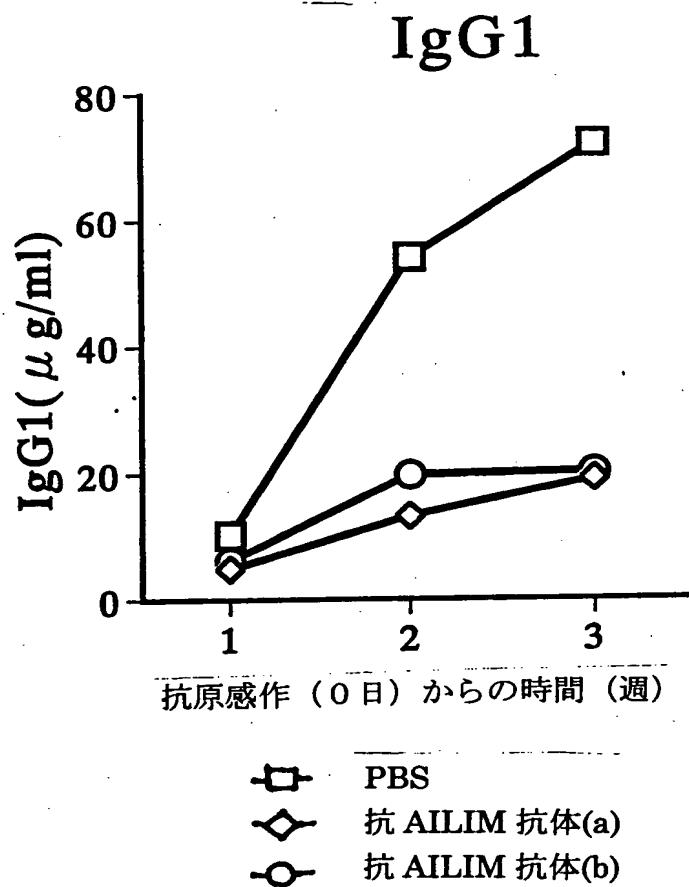
【図4 2】



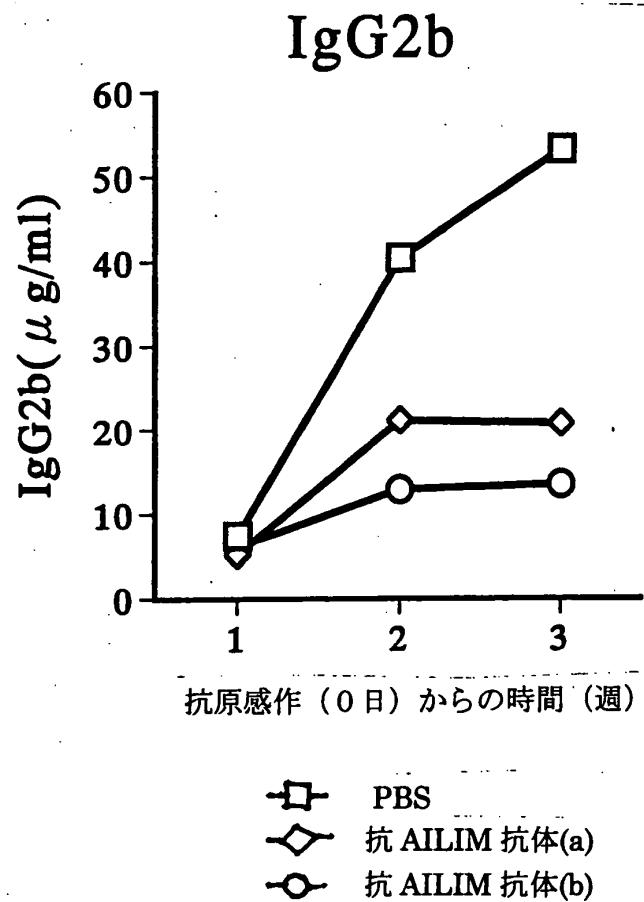
【図43】



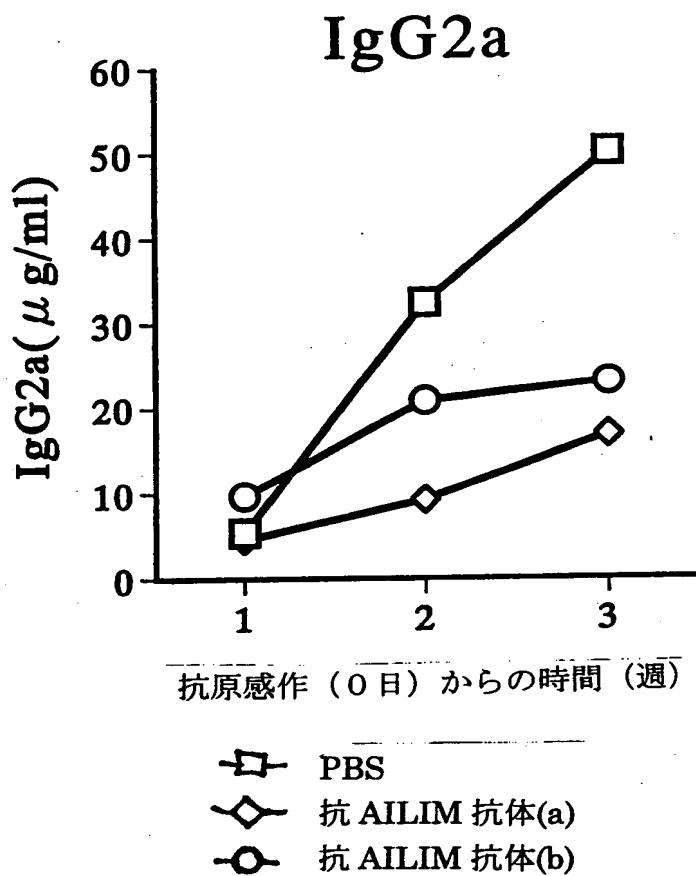
【図44】



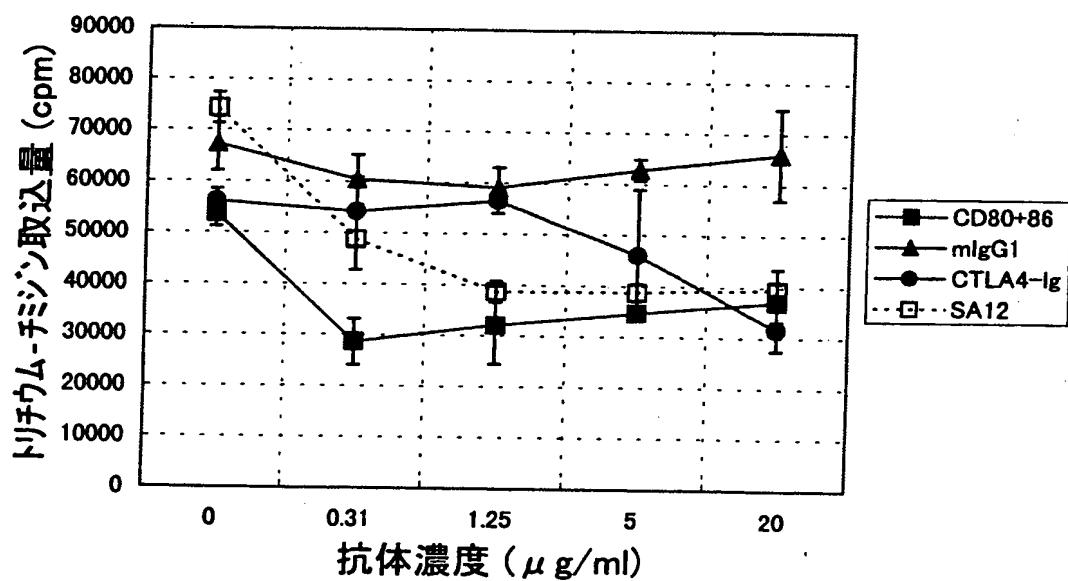
【図45】



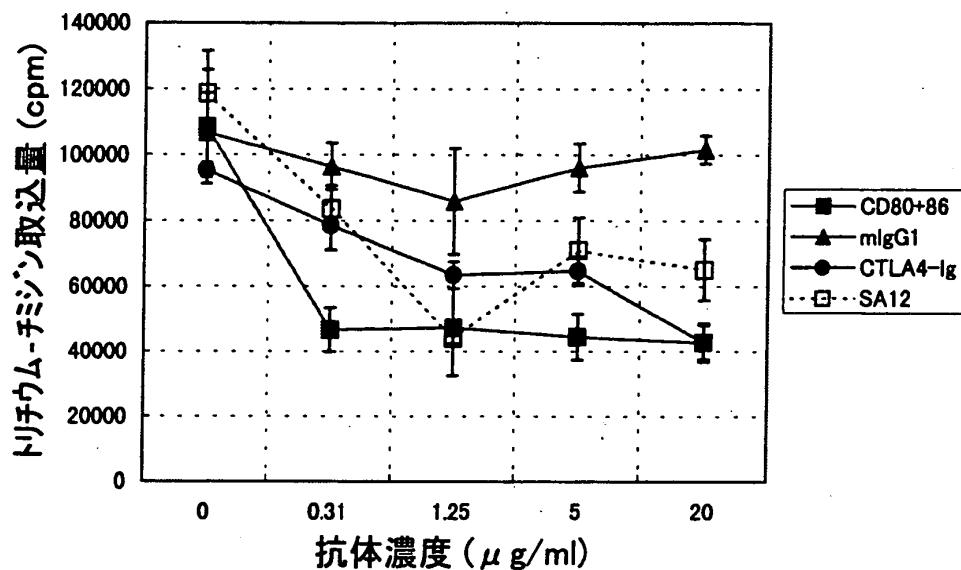
【図46】



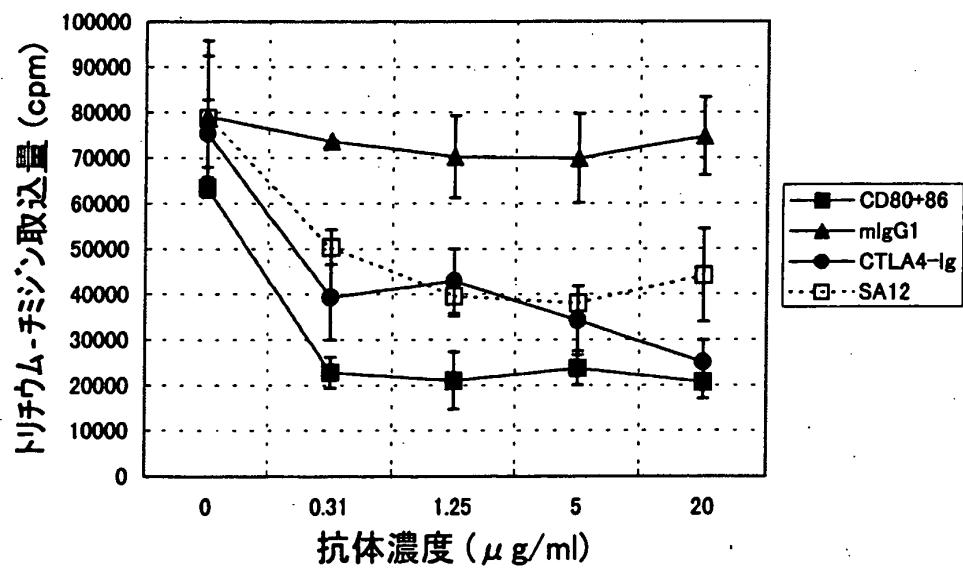
【図47】



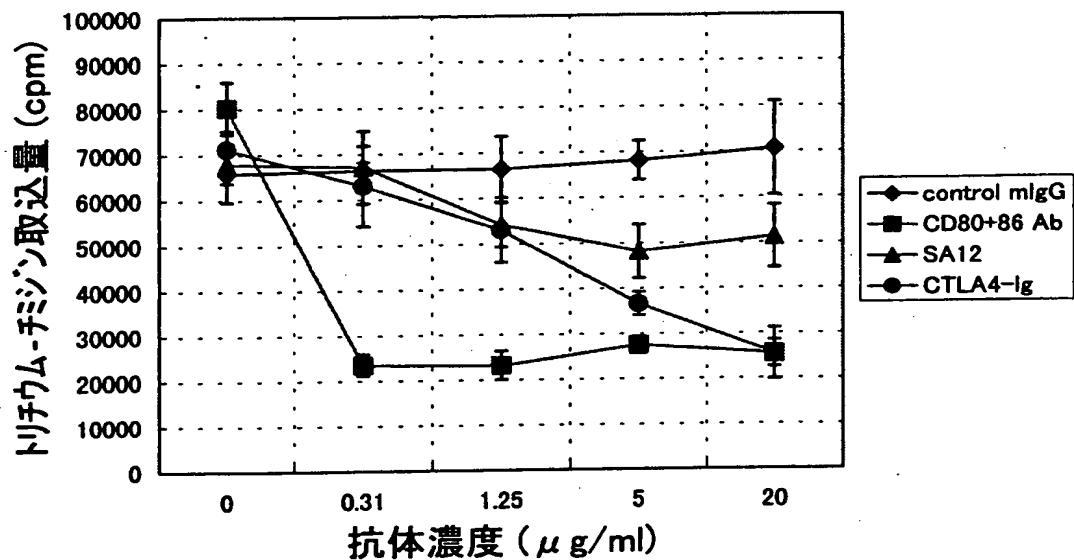
【図48】



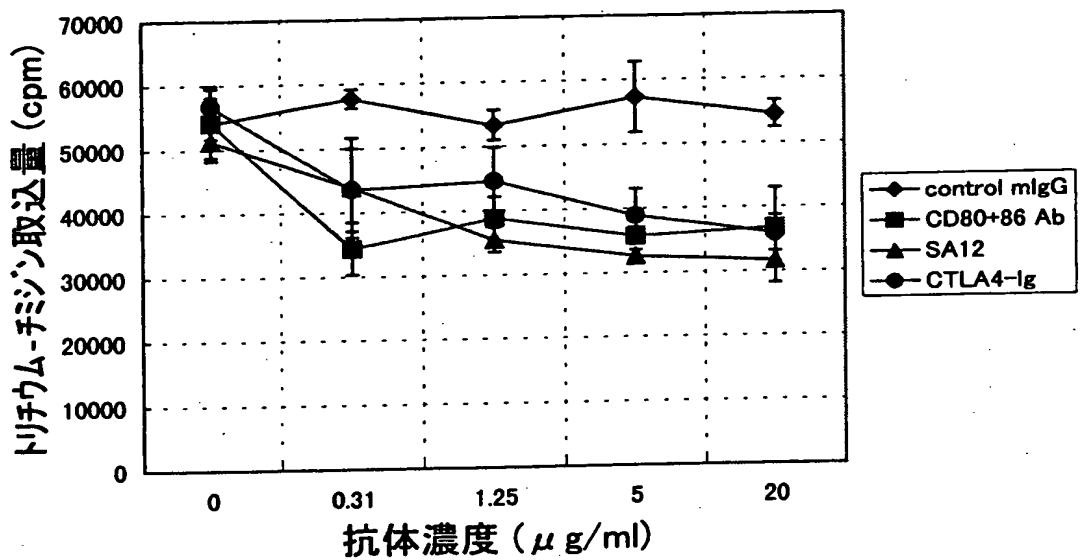
【図49】



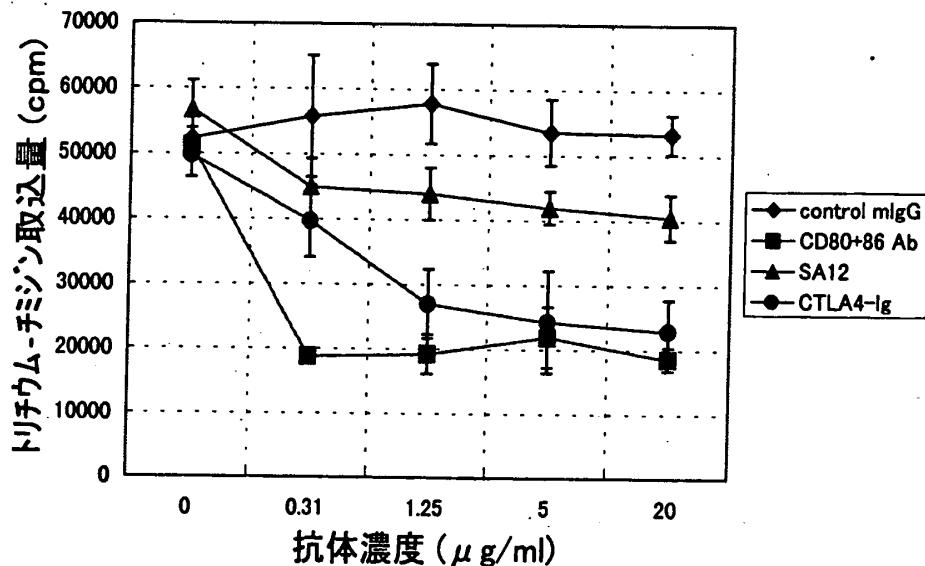
【図50】



【図51】



【図52】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 T細胞等のリンパ球の活性化並びに活性化リンパ球の機能制御の異常に起因する種々の自己免疫性疾患、アレルギー性疾患または炎症性疾患（例えば、関節リウマチや変形性関節症などの関節症、種々の移植に伴う病状（移植片対宿主病、移植免疫拒絶反応）、種々の縁種炎症（例えば、肝炎や炎症性腸疾患）、外来抗原による免疫感作により惹起される該抗原に対する抗体の過剰産生を伴う疾患症状など）を治療または予防するための医薬組成物を提供する。

【解決手段】 AILIM (JTT-1抗原、JTT-2抗原、ICOS及び8F4とも呼ぶ)に対する抗体が、関節リウマチや変形性関節症などの関節症、移植片対宿主病、移植免疫拒絶、炎症（肝炎や炎症性腸疾患）、外来抗原による免疫感作により惹起される該抗原に対する抗体の過剰産生を伴う疾患症状に対して有意な治療効果を有することを見出した。

【選択図】 なし

特2000-25468

認定・付加情報

|         |               |
|---------|---------------|
| 特許出願の番号 | 特願2000-254680 |
| 受付番号    | 50001076386   |
| 書類名     | 特許願           |
| 担当官     | 第五担当上席 0094   |
| 作成日     | 平成12年 8月29日   |

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成12年 8月24日

次頁無

出願人履歴情報

識別番号 [000004569]

1. 変更年月日 1995年 5月16日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号  
氏 名 日本たばこ産業株式会社

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**